

540 394

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年7月15日 (15.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/058817 A1(51) 国際特許分類:
C07K 14/47,
C12N 15/12, C12P 21/02, C12Q 1/68, C07K 16/18, A01K
67/027, C12N 5/10, G01N 33/15, 33/50, A61K 31/711,
38/17, 39/395, A61P 35/00司 (SATO, Shuji) [JP/JP]; 〒300-3261 茨城県 つくば市
花畑3丁目19-9-301 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016655

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.);
〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町2丁目
17番85号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Os-
aka (JP).

(22) 国際出願日: 2003年12月25日 (25.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-378052 2002年12月26日 (26.12.2002) JP
特願2003-65497 2003年3月11日 (11.03.2003) JP(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修
町四丁目1番1号 Osaka (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS,
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 砂原 英次
(SUNAHARA, Eiji) [JP/JP]; 〒300-0331 茨城県 稲敷
郡阿見町 大字阿見5351-5 Ibaraki (JP). 石井 尚
書 (ISHII, Takafumi) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城県 つ
くば市 並木4丁目1.6-1 Ibaraki (JP). 山本 紅司
(YAMAMOTO, Koji) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つく
ば市 春日1丁目7-9-1202 Ibaraki (JP). 佐藤 秀添付公開書類:
一 国際調査報告書2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PROTEINS AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 新規タンパク質およびその用途

(57) Abstract: A compound inhibiting the expression of a protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:10 or the expression of a gene of the protein, an antisense polynucleotide having a base sequence which is complementary or substantially complementary to the base sequence of DNA encoding the above protein or its peptide fragment or a part of the above base sequence, an antibody against the above protein or its peptide fragment, etc. are useful as preventives or remedies for cancer, etc., apoptosis promoters and so on.

(57) 要約: 配列番号: 1、配列番号: 4、配列番号: 7または配列番号: 10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質の発現または該タンパク質遺伝子の発現などを阻害する化合物、該タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド、該タンパク質またはその部分ペプチドに対する抗体などは、癌などの予防・治療剤、アポトーシス促進剤などとして有用である。

WO 2004/058817 A1

明 細 書

新規タンパク質およびその用途

5 技術分野

本発明は、新規タンパク質、それをコードするポリヌクレオチド、その製造法、癌の予防・治療剤または診断薬、アポトーシス促進剤、癌の予防・治療剤またはアポトーシス促進剤のスクリーニングなどに関する。

10 背景技術

近年のマイクロアレイ・オリゴヌクレオチドアレイ技術の進歩により、遺伝子発現の網羅的な解析が可能となってきた。癌においても遺伝子のマイクロアレイプロファイリングデータでその病態が評価しうることも予見され、実際、白血病においては遺伝子発現プロファイルによる白血病の分類が可能であることが報告されている。また個々の癌組織の遺伝子発現プロファイルを明らかにし、その分類を積み重ねることによって、特定の癌治療法に対する反応性を予測したり特定の癌に対する新たな創薬標的タンパク質を発見したりすることが可能となると考えられる。具体的には、ある種の癌である種のタンパク質の発現亢進が認められる場合には、新たに抗原陽性と診断された患者に対して (i) 15 その発現量を低下させる、(ii) 機能を抑制する、(iii) 該タンパク質に対する宿主免疫応答を顕在化させる等の方法によって抗腫瘍活性を導くことが可能となる。これと同時に、抗原陰性と診断された患者に対しては別の治療法への切替が迅速に行えるなど、患者に無用な負担をかける懸念がなくなると予想される。以上のように発現プロファイル解析は、癌の分子診断と分子標的治療薬 20 の開発に多大な貢献をなしうるものと期待されている。

Semaphorinファミリーは分泌型分子と膜結合型分子の両方から構成される大きなタンパク質ファミリーで、脊椎動物で少なくとも19種、非脊椎動物で3種の遺伝子が報告されている (Cell 97巻, 551-552頁, 1999年)。

Semaphorinファミリーは神経軸索誘導やシナプス形成などに代表される広範

困な神経発生過程に関わることが知られている。近年になり、Semaphorinファミリーの免疫系への関与 (Trends in Immunol. 22巻, 670-676頁, 2001年) や、臓器発生・血管新生における関与が明らかになりつつある。Semaphorinファミリーに属するヒト由来のSemaphorin 3B、Semaphorin 3Fは、癌抑制遺伝子として報告されている (Proc. Natl Acad. Sci. USA 98巻, 13954-13959頁, 2001年、Cancer Res. 62巻, 542-546頁, 2002年、Cancer Res. 62巻, 2637-2643頁, 2002年)。Semaphorin 3Cは、ヒト肺がん組織で発現が亢進しているという報告がある (J. Surg. Oncol. 72巻, 18-23頁, 1999年、Proc. Natl Acad. Sci. USA 94巻, 14713-14718頁, 1997年)。Semaphorin 3Eは転移性細胞で発現していると報告されている (Cancer Res. 58巻, 1238-1244頁, 1998年)。

Semaphorin4Dとアミノ酸レベルで相同性が41%のSemaphorin 4B (以下、SEMA4Bと略すこともある) はGenBankにゲノム配列から予想された遺伝子として登録されている (GenBank Accession No. XM_044533)。SEMA4Bは低酸素条件下で発現が上昇する遺伝子のひとつとして報告されている (WO 02/46465)。また、ジーンチップ解析に基づきSEMA4Bなどを含む数百種の塩基配列が、肺癌の診断または肺癌を治療する化合物の探索などに使用できるとの報告もある (WO 02/86443)。SEMA4Bとアミノ酸レベルで93%の相同性を有するNOV7は、癌で発現亢進していることが報告されている (WO 02/06329)。

癌細胞に特異的に発現する分子を標的とし、癌細胞の増殖阻害を誘導する安全な薬剤が切望されている。

発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、肺癌組織で発現が顕著に増加する新規遺伝子を見出し、この遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチドが癌細胞のアポトーシスを促進することも見出した。この知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質または

その塩、

(2) 配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、

(3) 上記(1)記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

5 (4) 上記(1)記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(5) DNAである上記(4)記載のポリヌクレオチド、

(6) 配列番号：5、配列番号：8または配列番号：11で表される塩基配列を含有する上記(5)記載のポリヌクレオチド、

10 (7) 配列番号：5、配列番号：8または配列番号：11で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド、

(8) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

(9) 上記(8)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(10) 上記(9)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のタンパク質
15 またはその部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩の製造法、

(11) 上記(1)記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(12) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

20 (13) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、

(14) 上記(1)記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

(15) 上記(14)記載の抗体を含有してなる医薬、

(16) 上記(14)記載の抗体を含有してなる診断薬、

25 (17) 上記(4)記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、

(18) 上記(17)記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、

(19) 上記(14)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質の定量方法、

(20) 上記(19)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記載のタンパク質またはその機能が関連する疾患の診断方法、

(21) 上記(1)記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(22) 上記(1)記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、上記(1)記載のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(22a) 上記(21)記載のスクリーニング方法または上記(22)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩、

(22b) 上記(22a)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(23) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(24) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを含有してなる、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(24a) 上記(23)記載のスクリーニング方法または上記(24)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、上記(1)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、

(24b) 上記(24a)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(25) 癌の予防・治療剤である上記(11)、(12)、(15)または(18)記載の医薬、

(25a) 癌が、肺癌、卵巣がんまたは膵臓癌である、上記(25)記載の医薬、

(25b) 癌の予防・治療剤である上記(22b)または(24b)記載の医薬、

(26) (癌細胞の)アポトーシス促進剤である上記(11)、(12)、

- (15) または (18) 記載の医薬、
- (26 a) (癌細胞の) アポトーシス促進剤である上記 (22 b) または (24 b) 記載の医薬、
- (26 b) 癌細胞の増殖阻害促進剤である上記 (11)、(12)、(15)、
- 5 (18)、(22 b) または (24 b) 記載の医薬、
- (27) 癌の診断薬である上記 (13) または (16) 記載の診断薬、
- (28) 上記 (1) 記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドの発現または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する物質を含有してなるアポトーシス促進剤、
- 10 (29) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなるアポトーシス促進剤、
- (30) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる癌の予防・治療剤、
- 15 (30 a) 癌が、肺癌、卵巣癌または膵臓癌である上記 (30) 記載の予防・治療剤、
- (30 b) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる癌細胞の増殖阻害促進剤、
- 20 (31) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド、
- 25 (32) 上記 (31) 記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬、
- (33) アポトーシス促進剤である上記 (32) 記載の医薬、
- (33 a) 癌細胞の増殖阻害促進剤である上記 (32) 記載の医薬、
- (34) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリ

ヌクレオチドを用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法、

- 5 (35) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング用キット、

(35a) 上記(34)記載のスクリーニング方法または上記(35)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるアポトーシス促進剤、

- 10 (36) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの発現または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する物質を含有してなるアポトーシス促進剤、

(36a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する物質を含有してなる癌細胞の増殖阻害促進剤、

- 15 (37) 哺乳動物に対し、(i) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する物質、(ii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する物質、または(iii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の有効量を投与することを特徴とする、癌の予防・治療法、
- 20

- (38) 哺乳動物に対し、(i) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する物質、(ii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する物質、または(iii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の有効量を投与することを特徴とする、癌細胞のアポトーシス促進方法、
- 25

(39) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で

表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する、または該タンパク質もしくはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害することを特徴とする癌の予防・治療法、

5 (40) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する、または該タンパク質もしくはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害することを特徴とする癌細胞のアポトーシス促進方法、

10 (41) 癌の予防・治療剤を製造するための (i) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する物質、(ii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する物質、または (iii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用、

15 (42) 癌細胞のアポトーシス促進剤を製造するための (i) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する物質、(ii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する物質、または (iii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用などを提供する。

発明を実施するための最良の形態

25 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称することもある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髓細胞、メサングウム細胞、ラ

5 ンゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、
10 胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

15 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と95%以上、好ましくは約98%以上、好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

20 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

25 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：4で表されるアミノ酸配列と99.9%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

30 配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：7で表されるアミノ酸配列と99.9%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

5 配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：7で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

10 配列番号：10で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：10で表されるアミノ酸配列と99.9%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

15 配列番号：10で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：10で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

20 アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；マトリクス=BLOSUM62；フィルタリング=OFF）にて計算することができる。

25 実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理的に）同質であることを示す。したがって、本発明のタンパク質の活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、（1）（i）配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（ii）配列番号：1

で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、(2) (i) 配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列中の1または2個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（例えば1～50個程度、好ましくは1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列に1または2個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列中の1または2個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピ

ル、イソプロピル、*n*-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

例えば、本発明で用いられるタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好

ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン

酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

5 本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

10 ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

15 本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

20

25

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられ

る。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

- 5 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド, N, N-ジメチルアセトアミド, N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフラン
- 10 などのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20~50℃の範囲から適宜選択される。
- 15 活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の
- 20 反応に影響を与えないようにすることができる。

- 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z, Boc, t-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z, Br-Z, アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジ
- 25 フェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘブチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、

4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

- 5 セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級 (C_{1-6}) アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テ
- 10 トラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、 Bz 1、 Cl_2 - Bz 1、2-ニトロベンジル、 $Br-Z$ 、*t*-ブチルなどが用いられる。

- ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、 Tos 、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、 DNP 、ベンジルオキシメチル、 Bum 、 Boc 、 Trt 、 $Fmoc$ などが用いられる。
- 15

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、 $HONB$ 、 N -ヒドロキシスクシミド、 N -ヒドロキシフタルイミド、 $HOBT$ ）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。
- 20

- 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、 Pd -黒あるいは Pd -炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、
- 25
- 一般に約 $-20^{\circ}C \sim 40^{\circ}C$ の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、

アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール

5 処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

10

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該

15 ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法に

20 よりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

25

本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダ

一で切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の (i) ~ (v) に記載された方法が挙げられる。

(i) M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(ii) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(iv) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

(v) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくはDNAである。DNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接 Reverse

Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、

- 5 (i) 配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、
- 10 (ii) 配列番号：5で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：5で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、
- 15 (iii) 配列番号：8で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：8で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、
- 20 (iv) 配列番号：11で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：11で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列と95%以上、好ましくは約98%以上、好ましくは約99%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

- 25 配列番号：5で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：5で表される塩基配列と99.9%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：8で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：8で表される塩基配列と

99. 9%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：11で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：11で表される塩基配列と99. 9%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、(i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表される塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：3で表される塩基配列を含有するDNAなどが、

(ii) 配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：5で表される塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：6で表される塩基配列を含有するDNAなどが、(iii) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：8で表される塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：9で表される塩基配列を含有するDNAなどが、(iv) 配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：11で表される塩基配列を含有するDNAまたは配列番号：12で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）としては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配

列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

5 本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8または配列番号：11で表される塩基配列を含有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8または配列番号：11で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分
10 を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8または配列番号：11で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

15 本発明で用いられるタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコード
20 するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行
25 なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCR、公知のキット、例えば、Mutan™-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan™-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じ

る方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGK

プロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

5 発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシング
シグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、
SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いること
ができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、d
hfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、
アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイ
10 シン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が
挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いて
dhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを
含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質の
15 N末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル
配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -ア
ミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母で
ある場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動
物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロ
20 ン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有す
るベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、
昆虫、動物細胞などが用いられる。

25 エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ
(*Escherichia coli*) K12・DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60
巻, 160(1968)] , JM103 [Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981)] , J
A221 [Journal of Molecular Biology, 120巻, 517(1978)] , HB101
[Journal of Molecular Biology, 41巻, 459(1969)] , C600 [Genetics, 39

巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI 1 1 4 [Gene, 24巻, 255(1983)] , 2 0 7 - 2 1 [Journal of Biochemistry, 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

- 5 酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH 2 2, AH 2 2 R⁻, NA 8 7 - 1 1 A, DKD - 5 D, 2 0 B - 1 2、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) N CYC 1 9 1 3, NCYC 2 0 3 6、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM 7 1 などが用いられる。

- 10 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell ; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N 細胞 ; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711) 、 Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo) , 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature) , 3 1 5 巻, 5 9 2 (1 9 8 5)] 。

- 20 動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記) , dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記) , マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, マウスATDC5細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

- 25 エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69巻, 2110(1972)やGene, 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、Molecular & General Genetics, 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、Methods in Enzymology, 194巻, 182-187(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

5 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、Bio/Technology, 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、Virology, 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

10 このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

15 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、成長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

20 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

25 宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、パーク

ホルダー (Burkholder) 最小培地 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 巻, 4505 (1980)] や 0.5 % カザミノ酸を含有する SD 培地 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地の pH は約 5 ~ 8 に調整するのが好ましい。培養は通常約 20 °C ~ 35 °C で約 24 ~ 72 時間行ない、必要
5 に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Nature, 195, 788 (1962)) に非動化した 10 % ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6.2 ~ 6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27 °C で約 3 ~ 5 日間行ない、必要
10 に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5 ~ 20 % の胎児牛血清を含む MEM 培地 [Science, 122 巻, 501 (1952)] , D MEM 培地 [Virology, 8 巻, 396 (1959)] , RPMI 1640 培地 [The
15 Journal of the American Medical Association, 199 巻, 519 (1967)] , 199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73 巻, 1 (1950)] などが用いられる。pH は約 6 ~ 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30 ~ 40 °C で約 15 ~ 60 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。
20

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトン X-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体ある
25

いは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。

これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用
5 する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルア
ミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換ク
ロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグ
ラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー
などの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用
10 する方法などが用いられる。

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法
あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られ
た場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他
の塩に変換することができる。

15 なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当なタン
パク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチ
ドを部分的に除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、
トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキ
ナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

20 かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイ
ム免疫アッセイやウェスタンブロットティングなどにより測定することができ
る。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する
抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を
25 認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れで
あってもよい。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、
抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合があ
る）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体

または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位
5 にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。
10

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリ
15 ドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリ
20 コール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は
25 1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が

使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロ

5 テインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って

10 行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業

15 （株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定

20 できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原

25 結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に

従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアタンパク質とハプテンとの混合比は、キャリアタンパク質に架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアタンパク質のカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA（以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある））の塩基配列に相補

的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよく、アンチセンスDNAが好ましい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、（イ）翻訳阻害を指向したアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが、（ロ）RNase HによるRNA分解を指向するアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、イントロンを含む本発明のDNAの全塩基配列の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドがそれぞれ好適である。

具体的には、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：12で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：11または配列番号：12で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖（デオキシリボース）は、2'-O-メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、塩基部分（ピリミジン、プリン）も化学修飾を受けたものであってもよく、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

- 10 本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできる該遺伝子に対応するアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とタンパク質との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される（指令にある）タンパク質のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パンドローム領域または3'端ヘアピンループなどは、好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子
- 15
- 20
- 25

内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係については、目的核酸が対象領域とハイブリダイズすることができる場合は、その目的核酸は、当該対象領域のポリヌクレオチドに対して「アンチセンス」

- 5 であるといえることができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）
- 10 または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、DNA:RNAハイブリッドであつてもよく、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、
- 15 公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、
- 20 例えばタンパク質（例、ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であつてもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および
- 25 「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。このような修飾

物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、
5 またはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、RNA、DNAまたは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては、核酸の硫黄誘導体、チオホスフェート誘導体、ポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものなどが挙げられる。本発明のアンチセン
10 スポリヌクレオチドは、例えば、以下のように設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンスポリヌクレオチドをより安定なものにする、アンチセンスポリヌクレオチドの細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、また、もし毒性があるような場合はアンチセン
15 スポリヌクレオチドの毒性をより小さなものにする。このような修飾は、例えばPharm Tech Japan, 8巻, 247頁または395頁, 1992年, Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993年などで数多く報告されている。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態
20 で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例、ホスホリピド、コレステロールなど）などの疎水性のものが挙げられる。付加
25 するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端または5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端または5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。

こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

5 アンチセンスポリヌクレオチドの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、または本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。

10 以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA）（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNAのアンチセンスポリヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。

15 本発明のタンパク質は、癌組織で発現が増加するので、疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、癌組織における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。よって、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチド、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩、または本発明のタンパク質に対する抗体を含有する医薬は、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、アポトーシス促進剤として使用することができる。

25

（１）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は癌組織で発現が亢進してしており、さらに、本発明のタンパク質の活性を阻害すると癌細胞がアポトーシスを起こす。従って、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば癌（例、大腸

癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など)の予防・治療剤、アポトーシス促進剤などとして使用することができる。

したがって、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供します。

具体的には、例えば、(i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の活性と、(ii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の活性とを比較することを特徴する本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法が用いられる。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主(形質転換体)が用いられる。宿主としては、例えば、COS 7細胞、CHO細胞、HEK 293細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。本発明のタンパク質を発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変換体の培養法と同様である。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

例えば、上記(ii)の場合における本発明のタンパク質の活性を、上記(i)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害させる試験化合物を、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物として選択することができる。

本発明のタンパク質の活性を阻害する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

さらに、本発明のタンパク質の遺伝子も、癌組織において発現が増加するので、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩も、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、アポトーシス促進剤などとして使用することができる。

したがって、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）は、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

10 スクリーニング方法としては、(iii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、(iv) 試験化合物の存在下、本発明で用いられるタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合との比較を行うことを特徴とするスクリーニング方法が挙げられる。

15 上記方法において、(iii) と (iv) の場合における、前記遺伝子の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードする mRNA 量）を測定して、比較する。

試験化合物および本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上記と同様のものが挙げられる。

20 タンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA 法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

25 mRNA 量の測定は、公知の方法、例えば、プローブとして配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8 または配列番号：11 で表される塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いるノーザンハイブリダイゼーション、あるいはプライマーとして配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8 または配列番号：11 で表される塩基配列またはその一部を含有する核酸を用いる PCR 法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

例えば、上記 (iv) の場合における遺伝子の発現を、上記 (iii) の場合に比

べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害させる試験化合物を、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物として選択することができる。

5 本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。

10 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

15 本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩はそれぞれ、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の治療・予防剤、アポトーシス促進剤などとして低毒性で安全な医薬として有用である。

20 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の予防・治療剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

25 例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネ

シウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、
5 例えば、上記化合物またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イ
10 オン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上
15 記化合物またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500mg、とりわけ注射剤では
20 5～100mg、その他の剤形では 10～250mg の上記化合物が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記化合物との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、
25 トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のタンパク

質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物またはその塩を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の1回投与量は投与対象、

5 対象疾患などによっても異なるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のタンパク質の遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを癌病変部に注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kg当たり

10 に換算した量を投与することができる。

（2）本発明のタンパク質の定量

本発明の抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定

15 量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

- （i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および
- 20 （ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC端部に反応する抗体

25 であることが望ましい。

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的に

は、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。

5 本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

10 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β －ガラクトシダーゼ、 β －グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

20 抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

25 サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と

2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメト

リーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の増加が検出された場合、例えば癌(例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など)である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタン

パク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

(3) 遺伝子診断薬

5 本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNA
10 Aの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（Genomics, 第5巻, 874~879頁（1989年）、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United
15 States of America, 第86巻, 2766~2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異などが検出された場合は、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、
20 脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）である可能性が高いと診断することができる。

(4) アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる
25 本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能や作用を抑制し、癌細胞のアポトーシスを誘導することができるので、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、

アポトーシス促進剤などとして使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤、促進剤などとして使用する場合、自体公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

また、例えば、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロ
5 ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッド
ウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、
ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、
サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチ
センスポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤な
10 どの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカ
テーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化し
て吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独またはリポゾームなどの担
15 体とともに製剤（注射剤）化し、静脈、皮下等に投与してもよい。

該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、乳癌の治療の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約0.1～100mg投与する。

20 さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、本発明のタンパク質をコードする
25 RNAの一部を含有するリボザイムなども、本発明の遺伝子の発現を抑制することができ、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能を抑制することができるので、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の

予防・治療剤、アポトーシス促進剤などとして使用することができる。

二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

5 リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221
10 頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造
 することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に
 公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のタ
 ンパク質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断
 され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げら
 れる。

 上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場
 合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することがで
 きる。

15 (5) 本発明の抗体を含有する医薬

 本発明の抗体は、癌細胞のアポトーシス誘導活性を有するため、例えば癌
 （例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓
 癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血
 液腫瘍など）の予防・治療剤（例、ワクチンなど）（好ましくは、肺癌、卵巣
20 癌、膵臓癌などの予防・治療剤など）、アポトーシス促進剤等として使用する
 ことができる。

 本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤、促進剤は低毒性であり、
 そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳
 動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に
25 対して経口的または非経口的（例、血管内投与、皮下投与など）に投与するこ
 とができる。好ましくはワクチンとして定法に従って投与することができる。

 本発明の抗体は、それ自体を投与しても良いし、または適当な医薬組成物と
 して投与しても良い。投与に用いられる医薬組成物としては、本発明の抗体お
 よびその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むも

のであっても良い。このような医薬組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤、ワクチン等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調整できる。注射剤の調整方法としては、例えば、上記本発明の抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水溶性液、または油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製できる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液等が用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等を併用してもよい。調製された注射液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製されても良い。

経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。このような組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有していても良い。錠剤用の担体、賦形剤としては、例えば、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムが用いられる。

上記の非経口用または経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。このような投薬単位の剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤が挙げられる。抗体の含有量としては、投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体が含有され

ていることが好ましい。

本発明の抗体を含有する上記予防・治療剤、調節剤の投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の乳癌の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01
5 ~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

10 本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与（例、血管内注射、皮下注射など）に適する剤形として提供される。

15 なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

さらに、本発明の抗体は、他の薬剤、例えばアルキル化剤（例、サイクロフォスファミド、イフォスファミド等）、代謝拮抗剤（例、メソトレキセート、5-フルオロウラシル等）、抗癌性抗生物質（例、マイトマイシン、アドリア
20 マイシン等）、植物由来抗癌剤（例、ビンクリスチン、ビンデシン、タキソール等）、シスプラチン、カルボプラチン、エトポキシドなどと併用してもよい。本発明の抗体および上記薬剤は、同時または異なった時間に、患者に投与すればよい。

25 (6) 本発明のタンパク質を含有する医薬

本発明のタンパク質は癌で過剰に発現していることから、癌患者の免疫系を活性化するために本発明のタンパク質を癌ワクチンとして用いることもできる。

例えば、強力な抗原提示細胞（例、樹状細胞）を本発明のタンパク質存在下

に培養し、該タンパク質を食食させた後に、再び患者の体内に戻す、所謂養子免疫療法などを好ましく適用し得る。体内に戻された樹状細胞は癌抗原特異的な細胞障害性T細胞を誘導、活性化することにより癌細胞を死滅させることが可能である。

5 また、本発明のタンパク質は、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防または治療のためのワクチン製剤として、安全に、哺乳動物（例、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ブタ）に投与することもできる。

10 該ワクチン製剤は、通常、本発明のタンパク質および生理学的に許容されうる担体を含有する。担体としては例えば、水、食塩水（生理食塩水を含む）、緩衝液（例、リン酸緩衝液）、アルコール（例、エタノール）などの液体の担体があげられる。

15 ワクチン製剤は、通常のワクチン製剤の製造方法に従って調製することができる。

通常、本発明のタンパク質は、生理学的に許容されうる担体に溶解または懸濁される。また、本発明のタンパク質と生理学的に許容されうる担体とを別々に調製し、用時それらを混合して用いてもよい。

20 ワクチン製剤には、本発明のタンパク質および生理学的に許容されうる担体に加え、アジュバント（例、水酸化アルミニウムゲル、血清アルブミンなど）、防腐剤（例、チメロサルなど）、無痛化剤（例、ブドウ糖、ベンジルアルコールなど）などを配合させてもよい。また、本発明のタンパク質に対する抗体産生を促進させるために、例えばサイトカイン（例、インターロイキン-2などのインターロイキン類、インターフェロン- γ などのインターフェロン類など）をさらに配合させてもよい。

25 ワクチン製剤として用いる際、本発明のタンパク質は活性体として用いてもよいが、抗原性を高めるために本発明のタンパク質を変性させてもよい。本発明のタンパク質の変性は、通常、加熱処理、タンパク質変性剤（例、ホルマリン、塩酸グアニジン、尿素）による処理により行われる。

得られたワクチン製剤は低毒性であり、通常注射剤として、例えば皮下、皮内、筋肉内に投与してもよく、また癌細胞塊またはその近傍に局所的に投与してもよい。

5 本発明のタンパク質の投与量は、例えば対象疾患、投与対象、投与ルートなどによって異なるが、例えば本発明のタンパク質を癌に罹患した成人（体重60kg）に皮下的に注射剤として投与する場合、1回当たり通常0.1～300mg程度、好ましくは100～300mg程度である。ワクチン製剤の投与回数は1回でもよいが、抗体産生量を高めるために、約2週間～約6ヶ月の間隔をあけて、該ワクチン製剤を2～4回投与することもできる。

10

(7) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

15 すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、
- (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および
- (4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

20

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAEーデキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培

25

養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションする

ことによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、入ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(i) ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、(ii) 各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウ

イルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子 1α (EF- 1α) のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外來性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

5 受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外來性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有する。

10

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質に関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

15

20 また、本発明の外來性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する予防・治療剤、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

25

一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外來DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのD

NAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質または機能不活性型不応症に対する予防・治療剤、例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤のスクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

(i) 組織培養のための細胞源としての使用、

(ii) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、

5 (iii) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

(iv) 上記 (iii) 記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

(v) 本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

10 さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

15 また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなど
20 ができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療
25 薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(8) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- 5 (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
- 10 (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- 15 (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および
- (10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 20 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。
- 25

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コード

ンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmaの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス（C57BL/6とDBA/2とのF₁）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用

いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 10^6 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1～10000 U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001～0.5%トリプシン/0.1～5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダ

一細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1～3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

5 E S細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, Nature、第292巻、154頁、1981年；G. R. Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 第78巻、7634頁、1981年；T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87
10 巻、27頁、1985年〕、本発明のE S細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別
15 することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDN
20 A配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析または
25 ターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒ

ト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

- 5 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

- 10 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

15 このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

- 20 さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

25 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質によ

り誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

- (8 a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防
5 効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

- すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物
10 を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病、例えば癌などに対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

- 15 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理
20 し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

- 試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の
25 性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニ

ングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、試験化合物非投与群と癌の発症度合いの違いや癌の治癒度合いの違いを上記組織で経時的に観察する。

- 5 該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の上記疾患症状が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上改善した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

- 10 該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

- 15 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。
- 20

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

- 25 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の乳癌患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、

好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の乳癌患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg、好ましくは約0.1~20mg、より好ましくは約0.1~10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

（8b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インド

リルーβ-ガラクトピラノシド (X-gal) のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明の

5 タンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-gal を含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS 溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZ をコードする mRNA を検出してもよい。

10 上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

15 該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、アルカリ金属など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用いられる。

20 本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現の阻害、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば癌 (例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎臓癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、脾臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など) の予防・治療剤として有用である。

25 さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造する

ことができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 5 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の乳癌患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1
- 10 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の乳癌患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg、好ましくは約0.1~20mg、より好ましくは約0.1~10mgを静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。
- 15

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療剤の開発に大きく貢献することができる。

- 20 また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパク質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。
- 25

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB

Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
5	c DNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
10	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
15	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
20	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
25	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸

	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
5	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
10	p G l u	: ピログルタミン酸
	S e c	: セレノシステイン (selenocysteine)

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

15	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
20	T o s	: p-トルエンスルフォニル
	C H O	: ホルミル
	B z l	: ベンジル
	C l ₂ -B z l	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
25	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
	B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェニル

- T r t : トリチル
 B u m : t-ブトキシメチル
 F m o c : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
 H O B t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
 5 H O O B t : 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-
 1,2,3-ベンゾトリアジン
 H O N B : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
 D C C : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

10 本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

SEMA 4 Bのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するSEMA 4 BをコードするD

15 NAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

SEMA 4 Bをコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

SEMA 4 B-M1のアミノ酸配列を示す。

20 〔配列番号：5〕

配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有するSEMA 4 B-M1をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

SEMA 4 B-M1をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

25 〔配列番号：7〕

SEMA 4 B-M2のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：8〕

配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有するSEMA 4 B-M2をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

SEMA4B-M2をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

SEMA4B-M3のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：11〕

配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有するSEMA4B-M3をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

SEMA4B-M3をコードする全長遺伝子を含むDNAの塩基配列を示す。

10 〔配列番号：13〕

実施例2、実施例3、実施例15および実施例16で用いられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

15 実施例2、実施例3、実施例15および実施例16で用いられたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

実施例3で用いられたアンチセンスオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

実施例3で用いられたオリゴヌクレオチドの塩基配列を示す。

20 〔配列番号：17〕

実施例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

実施例3で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

25 実施例4、実施例6および実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

実施例4および実施例7で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

[配列番号：22]

実施例 8 で用いられたペプチド 1 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：23]

5 実施例 8 で用いられたペプチド 2 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：24]

実施例 8 で用いられたペプチド 3 のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：25]

実施例 8 で用いられたペプチド 4 のアミノ酸配列を示す。

10

後述の実施例 4 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* TOP10/SEMA4B-M1/pCR4-TOP0 は、2003 年 3 月 4 日から茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号 FERM BP-8316 として寄託されている。

15

後述の実施例 4 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* TOP10/SEMA4B-M2/pCR4-TOP0 は、2003 年 3 月 4 日から茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号 FERM BP-8317 として寄託されている。

後述の実施例 4 で得られた形質転換体 *Escherichia coli* TOP10/SEMA4B-

20

M3/pCR4-TOP0 は、2003 年 3 月 4 日から茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号 FERM BP-8318 として寄託されている。

以下において、実施例により本発明をより具体的に示すが、この発明はこれらに限定されるものではない。

25

実施例 1

遺伝子発現解析

肺がん組織で特異的に発現亢進している遺伝子群を明らかにするため、肺が

ん組織4例、正常肺組織5例から抽出されたtotal RNA (表1) を材料とし、oligonucleotide microarray (Human Genome U95A, U95B, U95C, U95D, U95E; Affymetrix社) を用いて遺伝子発現解析を行った。実験方法は、Affymetrix社の実験手引き書 (Expression analysis technical manual) に従った。

- 5 その結果、肺がん組織3例 (lot.0011-192-01285、lot.0011-192-01293およびlot.0011-192-01297) において、Semaphorin 4B (SEMA4B) および後述の実施例4記載のSemaphorin 4B-M1 (SEMA4B-M1)、Semaphorin 4B-M2 (SEMA4B-M2) ならびにSemaphorin 4B-M3 (SEMA4B-M3) 遺伝子の発現亢進が検出された (表2)。

10 [表1]

	RNAを抽出した組織	販売元
	肺がん組織 (lot.0009-192-00122)	BioClinical Partners 社
	肺がん組織 (lot.0011-192-01285)	BioClinical Partners 社
15	肺がん組織 (lot.0011-192-01293)	BioClinical Partners 社
	肺がん組織 (lot.0011-192-01297)	BioClinical Partners 社
	正常肺組織 (lot.0009-192-00150)	BioClinical Partners 社
	正常肺組織 (lot.0009-192-00168)	BioClinical Partners 社
	正常肺組織 (lot.0011-192-01283)	BioClinical Partners 社
20	正常肺組織 (lot.0011-192-01285)	BioClinical Partners 社
	正常肺組織 (lot.0011-192-01297)	BioClinical Partners 社

[表2]

	組織	遺伝子発現量
25	肺がん組織 (lot.0009-192-00122)	ND
	肺がん組織 (lot.0011-192-01285)	10
	肺がん組織 (lot.0011-192-01293)	9.5

	肺がん組織 (lot.0011-192-01297)	1.9
	正常肺組織 (lot.0009-192-00150)	ND
	正常肺組織 (lot.0009-192-00168)	ND
	正常肺組織 (lot.0011-192-01283)	ND
5	正常肺組織 (lot.0011-192-01285)	ND
	<u>正常肺組織 (lot.0011-192-01297)</u>	<u>ND</u>

遺伝子発現量は、oligonucleotide microarrayで発現が検出された
全遺伝子の発現量の中央値を1として標準化した。

ND; not detected

10

実施例 2

ヒト肺癌細胞株のアポトーシス誘発

SEMA4Bおよび後述の実施例 4 記載のSEMA4B-M1、SEMA4B-M2ならびにSEMA4B-M3
遺伝子の発現を抑制することにより、ヒト肺がん細胞株のアポトーシスが誘発
15 されるか否かを調べた。

まず、アメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC) より購入したヒト
非小細胞肺がん細胞株NCI-H1703を、RPMI-1640培地 (25mM HEPES含有)

(Invitrogen社) に牛胎仔血清 (ATCC) を10%加えた培地で懸濁し、1ウェル当
たり1万個の細胞密度 (培地液量0.1ml) で96穴平底組織培養プレート (BDファ
20 ルコン社) に播種した。5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した後、アンチセ
ンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクションした。

具体的には、配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7および配列番号：
10 で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の3'非翻訳領域配列にハイブ
リダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチド配列 (配列番号：13) を設計
25 後、phosphorothioate化オリゴヌクレオチドを合成し、HPLC精製して導入実験
に用いた (以下、アンチセンスオリゴヌクレオチドと略する)。コントロール
としては、配列番号：13で示される塩基配列のリバーズ配列 (配列番号：1
4) を同様にphosphorothioate化し、HPLC精製して用いた (以下、コントロー

ルオリゴヌクレオチドと略する)。

Opti-MEM (Invitrogen社) で希釈したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはコントロールオリゴヌクレオチドを、Opti-MEM (Invitrogen社) で5倍に希釈し室温で5分間放置したオリゴフェクトアミン (Invitrogen社) と8:3の割合

- 5 (容量比) で混合し、1ウェル当たり40 μ Lの割合でプレートに添加した。オリゴヌクレオチドの終濃度は250nMとなるよう調整した。上記の条件で更に3日間培養した後、Cell Death Detection ELISA^{PLUS}キット (Roche Diagnostics社) を用いて添付プロトコールに従い、上記の2種類のオリゴヌクレオチドのアポトーシス誘導活性を測定した。

- 10 その結果、アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 3) はコントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 4) に比べて約1.6倍のアポトーシス誘導活性を示し、統計学的に有意な差 ($P \leq 0.01$) を示した (表 3)。

〔表 3〕

	アポトーシス誘導活性 ($A_{405} - A_{492}$)	
	平均値	標準偏差
ブランク	0. 2 1 2	0. 0 3 2
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 4)	0. 4 1 0	0. 0 1 7
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 3)	0. 5 3 8	0. 0 3 5

15

実施例 3

SEMA4B アンチセンスオリゴヌクレオチドによる遺伝子発現量の低下

アンチセンスオリゴヌクレオチド投与により、SEMA4Bおよび後述の実施例 4 記載のSEMA4B-M1、SEMA4B-M2ならびにSEMA4B-M3遺伝子の発現量が低下するか否

20

か調べた。

実施例 2 で用いたヒト非小細胞肺癌細胞株NCI-H1703を実施例 2 と同じ培地に懸濁し、1ウェル当たり6万個の細胞密度 (培地液量0.6ml) で24穴平底組織培

養プレート（BDファルコン社）に播種した。5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した後、実施例2の方法に準じてアンチセンスオリゴヌクレオチドをトランスフェクションした。但し、オリゴヌクレオチドの添加量は1ウェル当たり240 μ Lとし、アンチセンスオリゴヌクレオチドとして2種類（配列番号：13および配列番号：15）、コントロールオリゴヌクレオチドとして2種類（配列番号：14および配列番号：16）のオリゴヌクレオチドを用いた。

配列番号：15および配列番号：16に由来するアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびコントロールオリゴヌクレオチドに関しては、配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7および配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質の3'非翻訳領域配列にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチド配列（配列番号：15）を設計後、phosphorothioate化オリゴヌクレオチドを合成し、HPLC精製して導入実験に用いた。配列番号：15で示される塩基配列のリバーズ配列（配列番号：16）を同様にphosphorothioate化し、HPLC精製して用いた。

トランスフェクション後、5%炭酸ガス気流中、37℃で24時間培養を継続した後、RNeasy（登録商標）Mini Total RNA Kit（QIAGEN社）を用いてトータルRNAを抽出した。約300ngのトータルRNAを鋳型として、TaqMan Reverse Transcription Reagents（Applied Biosystems社）を用いて添付プロトコールに従い逆転写反応した。トータルRNAにして7~9ngに相当するcDNAを鋳型とし、2種類のプライマー（配列番号：17および配列番号：18）とSYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystems社）を用いてSEMA4B、SEMA4B-M1、SEMA4B-M2およびSEMA4B-M3遺伝子の発現コピー数を測定した。同量の鋳型cDNA中に含まれる β -アクチン遺伝子発現量をTaqMan β -actin Control Reagents（Applied Biosystems社）を用いて測定し内部標準とした。

オリゴヌクレオチド溶液の代わりに蒸留水を用いた場合（以下、非トランスフェクション群と略する）では、SEMA4B、SEMA4B-M1、SEMA4B-M2およびSEMA4B-M3遺伝子発現量の総和は β -アクチン遺伝子発現量の6.6%であったのに対し、アンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号：13および配列番号：15）投与群では0.98%および1.1%であり、統計学的に有意（ $P \leq 0.05$ ）な遺伝子の発

現量低下が認められた。

一方、コントロールオリゴヌクレオチド（配列番号：14および配列番号：16）投与群では4.1%および3.4%であり、非トランスフェクション群と比べて統計学的に有意な発現量低下は認められなかった。

- 5 これより、SEMA4B、SEMA4B-M1、SEMA4B-M2およびSEMA4B-M3遺伝子の発現抑制とアポトーシス誘導とは相関することがわかった。

実施例 4

- 10 SEMA4B、SEMA4B-M1、SEMA4B-M2およびSEMA4B-M3をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

- 15 ヒト肺がん細胞株（A549）由来のMarathon-Ready cDNA（CLONTECH社）を鋳型とし、2種のプライマー（配列番号：19および配列番号：20）を用いてPCR反応を行った。該反応液50 μ lは、1 μ lの上記cDNA、2.5U PfuTurbo Hotstart DNA Polymerase（STRATAGENE社）、各1.0 μ Mのプライマー（配列番号：19および配列番号：20）、200 μ M dNTPs、および25 μ l 2x GC Buffer I（宝酒造社）を含む組成とした。PCR反応は、95 $^{\circ}$ C・1分の後、95 $^{\circ}$ C・1分、60 $^{\circ}$ C・1分、72 $^{\circ}$ C・4分を30サイクル繰り返し、さらに72 $^{\circ}$ C・5分間伸長反応を行った。PCR反応産物の3'端にdATPを付加するため、5UのEx Taq DNA Polymerase（宝酒造社）を添加して72 $^{\circ}$ C・7分間保温した。得られたPCR反応産物は、PCR Purification
20 Kit（QIAGEN社）を用いて精製した。これをTOPO TA PCRクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR4-TOPO（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入後、アンピシリンを含むLB寒天培地中でcDNAを持つクローンを選択した。個々のクローンについて塩基配列を解析した結果、配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8、および配列
25 番号：11で表されるcDNAの塩基配列がそれぞれ得られた。

SEMA4B遺伝子（GeneBank Accession No. XM_044533遺伝子）の塩基配列の1～237番目および2749～3766番目の塩基配列を、配列番号：2、配列番号：5、配列番号：8および配列番号：11で表される塩基配列の5'端および3'端にそれぞれ付加した塩基配列を、それぞれ配列番号：3、配列番号：6、配列番号：9

および配列番号：12に示す。

配列番号：2で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列（配列番号：1）は、SEMA4B遺伝子（GeneBank Accession No. XM_044533遺伝子）がコードするSEMA4Bタンパク質と完全に一致した。

- 5 配列番号：5で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列（配列番号：4）を含有するタンパク質をSEMA4B-M1、配列番号：8で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列（配列番号：7）を含有するタンパク質をSEMA4B-M2、配列番号：11で表される塩基配列がコードするアミノ酸配列（配列番号：10）を含有するタンパク質をSEMA4B-M3とそれぞれ命名した。

- 10 SEMA4B-M1のアミノ酸配列（配列番号：4）は、SEMA4Bのアミノ酸配列（配列番号：1）の208番目のSerがIleに置換されている。

- 15 SEMA4B-M1をコードするDNAの塩基配列（配列番号：5）では、SEMA4BをコードするDNAの塩基配列（配列番号：2）の90番目のgがaに、111番目のgがaに、623番目のgがtにそれぞれ置換されており、623番目の置換がアミノ酸置換を伴っている。

SEMA4B-M2のアミノ酸配列（配列番号：7）は、SEMA4Bのアミノ酸配列（配列番号：1）の163番目のMetがIleに置換されている。

- 20 SEMA4B-M2をコードするDNAの塩基配列（配列番号：8）では、SEMA4BをコードするDNAの塩基配列（配列番号：2）の150番目のgがaに、489番目のgがaに、528番目のcがtに、1266番目のtがcに、1588番目のcがaに、2343番目のaがgにそれぞれ置換されており、489番目の置換がアミノ酸置換を伴っている。

SEMA4B-M3のアミノ酸配列（配列番号：10）は、SEMA4Bのアミノ酸配列（配列番号：1）の364番目のLysがAsnに置換されている。

- 25 SEMA4B-M3をコードするDNAの塩基配列（配列番号：11）では、SEMA4BをコードするDNAの塩基配列（配列番号：2）の1092番目のgがtに置換されており、アミノ酸置換を伴っている。

配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAを有するプラスミドをSEMA4B/pCR4-TOP0、配列番号：5で表される塩基配列を有するDNAを有するプラスミドをSEMA4B-M1/pCR4-TOP0、配列番号：8で表される塩基配列を有するDNA

を有するプラスミドをSEMA4B-M2/pCR4-TOP0、配列番号：11で表される塩基配列を有するDNAを有するプラスミドをSEMA4B-M3/pCR4-TOP0とそれぞれ名付けた。

さらに、プラスミドSEMA4B/pCR4-TOP0が導入された形質転換体をEscherichia coli TOP10/SEMA4B/pCR4-TOP0、プラスミドSEMA4B-M1/pCR4-TOP0が導入された形質転換体をEscherichia coli TOP10/SEMA4B-M1/pCR4-TOP0、プラスミドSEMA4B-M2/pCR4-TOP0が導入された形質転換体をEscherichia coli TOP10/SEMA4B-M2/pCR4-TOP0、プラスミドSEMA4B-M3/pCR4-TOP0が導入された形質転換体をEscherichia coli TOP10/SEMA4B-M3/pCR4-TOP0とそれぞれ命名した。

10 実施例 5

ヒト培養細胞株における遺伝子発現量の検討

以下で使用される脳腫瘍細胞株 SK-N-MC、SK-N-AS、SK-N-BE、SK-N-DZ、SK-N-FI、SK-N-SH、D341Med、Daoy、DBTRG-05MG、U-118 MG、U-87 MG、CCF-STTG1 および SW 1088；ヒト乳癌細胞株 HCC1937、ZR-75-1、AU565、MCF-7 および MDA-MB-231；ヒト大腸癌細胞株 Caco-2、COLO201、COLO 205、COLO 320DM、HCT-8、HT-29、LoVo、LS123、SNU-C1、SK-CO-1、SW 403、SW 48、SW480、SW 620、SW 837 および SW 948；ヒト胎児腎臓細胞株 HEK293；ヒト小細胞肺癌細胞株 NCI-H187、NCI-H378、NCI-H526、NCI-H889、NCI-H1672、NCI-H1836、NCI-H2227、NCI-N417 および SHP-77；ヒト非小細胞肺癌細胞株 A549、NCI-H23、NCI-H226、NCI-H358、NCI-H460、NCI-H522、NCI-H661、NCI-H810、NCI-H1155、NCI-H1299、NCI-H1395、NCI-H1417、NCI-H1435、NCI-H1581、NCI-H1651、NCI-H1703、NCI-H1793、NCI-H1963、NCI-H2073、NCI-H2085、NCI-H2106、NCI-H2228、NCI-H2342 および NCI-H2347；ヒト卵巣癌細胞株 ES-2、Caov-3、MDAH2774、NIH:OVCAR3、OV-90、SK-OV-3、TOV-112D および TOV-21G；ヒト膵臓癌細胞株 PANC-1、MIA-PaCa-2、AsPC-1、BxPC-3、Capan-1 および Capan-2；ヒト前立腺癌細胞株 DU145；ヒト網膜芽腫細胞株 WERI-Rb-1 および Y79；ヒト精巣癌細胞株 Cates-1B の 86 株は、ATCC より購入した。ヒト正常気道上皮細胞 SAEC およびヒト正常前立腺上皮細胞 HPrEC は、Clonetics 社より購入した。ヒト大腸癌細胞株 COCM1、ヒト非小細胞肺癌細胞株 VMRC-LCD およびヒト前立腺

癌細胞株 PC3 は、JCRB より購入した。これら細胞株は実施例 9 以降の実施例でも用いることがある。

上記細胞株 91 株より RNeasy Mini Total RNA Kit (QIAGEN 社) を用いてトータル RNA を調製した。このトータル RNA を鋳型としてランダムプライマーを用いた逆転写反応で cDNA を調製し、定量的 PCR 反応を行うことにより、

5 SEMA4B 遺伝子 (配列番号: 2)、SEMA4B-M1 遺伝子 (配列番号: 5)、SEMA4B-M2 遺伝子 (配列番号: 8) および SEMA4B-M3 遺伝子 (配列番号: 11) の発現量を検討した。

該 PCR 反応は、上記トータル RNA 3~4ng より得られた cDNA を鋳型として使用し、実施例 3 と同一条件で PCR 反応を行い、SEMA4B、SEMA4B-M1、SEMA4B-M2

10 および SEMA4B-M3 遺伝子の発現コピー数を算出した。並行して TaqMan™ Human β -actin Control Reagents (Applied Biosystems 社) を用いて上記トータル RNA 1 ng に含まれる β -アクチン遺伝子のコピー数を算出し内部標準とした。

上記遺伝子全体の発現量を、 β -アクチン遺伝子発現量で標準化した相対的発現率を表 4 に示す。

15

上記遺伝子発現量の総量が β -アクチン遺伝子発現量の 1% を超える癌細胞株が 17 株見出され、上記遺伝子の癌細胞株における高発現が認められた。

〔表 4〕

細胞株	% of β -actin	細胞株	% of β -actin	細胞株	% of β -actin
SK-N-MC	0.02	COLO 201	0.66	NCI-H889	0.07
SK-N-AS	0.07	COLO 205	0.40	NCI-H1672	0.10
SK-N-BE	0.04	COLO 320DM	0.12	NCI-H1836	0.08
SK-N-DZ	0.05	HCT-8	0.36	NCI-H2227	0.15
SK-N-FI	0.20	HT-29	0.52	NCI-N417	0.04
SK-N-SH	0.11	LoVo	0.58	SHP-77	0.16
D341 Med	0.05	LS123	0.04	A549	0.35
Daoy	0.08	SNU-C1	0.52	NCI-H23	0.98
DBTRG-05MG	0.01	SK-CO-1	0.45	NCI-H226	0.04
U-118 MG	0.01	SW 403	0.31	NCI-H358	1.09
U-87 MG	0.20	SW 48	0.06	NCI-H460	0.08
CCF-STTG1	0.23	SW 480	0.03	NCI-H522	0.05
SW 1088	0.06	SW 620	0.12	NCI-H661	0.05
HCC1937	0.17	SW 837	0.59	NCI-H810	0.03
ZR-75-1	0.30	SW 948	0.18	NCI-H1155	0.07
AU565	0.06	HEK293	0.05	NCI-H1299	0.10
MCF-7	0.06	SAEC	1.73	NCI-H1395	0.39
MDA-MB-231	0.06	NCI-H187	0.38	NCI-H1417	0.21
Caco-2	0.04	NCI-H378	0.17	NCI-H1435	0.26
COCM1	0.10	NCI-H526	0.14	NCI-H1581	0.16
NCI-H1651	1.03	ES-2	0.02	BxPC-3	0.17
NCI-H1703	0.21	Caov-3	0.13	Capan-1	0.07
NCI-H1793	0.29	MDAH2774	0.37	Capan-2	0.27
NCI-H1963	0.12	NIH:OVCA3	0.14	HPrEC	2.87
NCI-H2073	0.15	OV-90	0.23	DU 145	3.05
NCI-H2085	0.02	SK-OV-3	2.44	PC3	0.43
NCI-H2106	0.07	TOV-112D	0.06	WERI-Rb-1	0.90
NCI-H2228	1.89	TOV-21G	1.00	Y79	0.06
NCI-H2342	0.18	PANC-1	1.88	Cates-1B	0.01
NCI-H2347	0.24	MIA-PaCa-2	0.02		
VMRC-LCD	0.09	AsPC-1	0.24		

実施例 6

組換え型完全長タンパク質の動物細胞用発現ベクターの構築

- 実施例 4 で得たプラスミド SEMA4B/pCR4-TOPO を鋳型とし、PCR で SEMA4B 遺伝子を増幅した。該反応における反応液の組成は SEMA4B/pCR4-TOPO 2ng を鋳型として使用し、Pfu Turbo Hotstart DNA Polymerase (STRATAGENE 社) を 2.5U、2 種類のプライマー (配列番号: 19 および配列番号: 21) を各 1 μ M、dNTPs を 200 μ M、および 10x Pfu Buffer を 5 μ l 加え、50 μ l の液量とした。PCR 反応は、95 $^{\circ}$ C \cdot 1 分の後、95 $^{\circ}$ C \cdot 1 分、60 $^{\circ}$ C \cdot 1 分、72 $^{\circ}$ C \cdot 4 分のサイクルを 25 回繰り返し行った。次に PCR Purification Kit (QIAGEN 社) にて該 PCR 反応産物を精製した後、制限酵素 Xba I および Eco RI にて処理した。プラスミド p3xFLAG-CMV-14 (Sigma 社) も Xba I および Eco RI にて処理した。それぞれの DNA 断片は PCR Purification Kit にて精製し、DNA Ligation Kit ver. 2 (Takara Bio 社) を用いてライゲーション反応を行った。ライゲーション反応液を大腸菌 TOP10 に導入した後、形質転換された大腸菌をアンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択し個々のクローンを解析した結果、SEMA4B 遺伝子 (配列番号: 2) に相当する cDNA 断片を含むプラスミド pCMV-14- SEMA4B を得た。

実施例 7

20 組換え型タグ付き完全長タンパク質の動物細胞用発現ベクターの構築

- SEMA4B タンパク質の C 末端に 3xFLAG タグを融合したタンパク質を発現する動物細胞用発現ベクターを構築した。SEMA4B 遺伝子を PCR で増幅する時に用いるプライマーペアを、別のプライマーペア (配列番号: 19 および配列番号: 20) に変更したこと以外は実施例 6 記載の方法に従い、形質転換した大腸菌の選別を行った。その結果、SEMA4B タンパク質 (配列番号: 1) の C 末端に 3xFLAG タグが融合したタンパク質をコードする cDNA 断片を含むプラスミド pCMV-14-SEMA4B-3xFLAG を得た。

実施例 8

ペプチド抗体の作製と精製

SEMA4B タンパク質（配列番号：1）、SEMA4B-M1 タンパク質（配列番号：4）、SEMA4B-M2 タンパク質（配列番号：7）および SEMA4B-M3 タンパク質（配列番号：10）のアミノ酸配列に基づき、12～15 アミノ酸からなる以下の4種のペプチド（ペプチド1～4）を Fmoc 固相合成法により合成した。

ペプチド1のアミノ酸配列〔Asn-Ser-Ala-Arg-Glu-Arg-Lys-Ile-Asn-Ser-Ser-Cys（配列番号：22）〕は、SEMA4B タンパク質（配列番号：1）の402番目から412番目までのアミノ酸配列のC末端に、Cysを付加した配列である。

ペプチド2のアミノ酸配列〔Ser-Val-Val-Ser-Pro-Ser-Phe-Val-Pro-Thr-Gly-Glu-Lys-Pro-Cys（配列番号：23）〕のアミノ酸配列は、SEMA4B タンパク質（配列番号：1）の582番目から596番目までの配列である。

ペプチド3のアミノ酸配列〔Pro-Leu-Asp-His-Arg-Gly-Tyr-Gln-Ser-Leu-Ser-Asp-Ser-Pro-Cys（配列番号：24）〕は、SEMA4B タンパク質（配列番号：1）の781番目から794番目までのアミノ酸配列のC末端に、Cysを付加した配列である。

ペプチド4のアミノ酸配列〔Ser-Arg-Val-Phe-Thr-Glu-Ser-Glu-Lys-Arg-Pro-Leu-Ser-Cys（配列番号：25）〕は、SEMA4B タンパク質（配列番号：1）の797番目から809番目までのアミノ酸配列のC末端に、Cysを付加した配列である。

上記ペプチド1、ペプチド2、ペプチド3およびペプチド4のそれぞれのペプチドに、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）をキャリアタンパク質として結合させ抗原とし、以下のように、ウサギポリクローナル抗体を作製した。

免疫動物は雄性ウサギ KBL:JW（11週齢、オリエンタル酵母）一羽を用い、初回感作は完全フロインドアジュバンド（Difco 社）懸濁液、2回目以降は不完全フロインドアジュバンド（Difco 社）懸濁液を用いた。感作は背部皮下注射により行い、1回の感作には各抗原 0.5mg を用い、初回感作後 14 日毎に 3 回繰り返した。初回感作後 52 日目に麻酔下頸動脈採血を行い、血清約 50ml を得た。このようにして得られた血清を硫酸アンモニウム塩析法により濃縮し、

得られた粗 IgG 画分全量をプロテイン A アフィニティーカラム (Amersham-Bioscience 社) により精製し、ペプチド 1、ペプチド 2、ペプチド 3 またはペプチド 4 を免疫したウサギから、それぞれ約 103mg、約 76mg、約 112mg および約 122mg の精製 IgG を得た。さらに、各々の免疫源ペプチドを固定化したカラムに結合する IgG 画分を取得した。固定化には各ペプチドの C 末端の Cys を利用し、ホウ酸緩衝液を用いてセファロースカラム (Amersham-Bioscience 社) にカップリングした。カラムからの溶出には 8M 尿素/リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を用いた。溶出液を PBS に対して透析して尿素を除いた後、限外濃縮、フィルターろ過滅菌することにより、ペプチド 1、ペプチド 2、ペプチド 3 およびペプチド 4 に対するアフィニティー精製抗体 AS-2531、AS-2532、AS-2591 および AS-2592 を、約 15mg、約 126mg、約 17mg および約 35mg ずつ取得した。

実施例 9

15 ウサギペプチド抗体を用いたウエスタンブロッティング

SEMA4B タンパク質 (配列番号: 1) の検出は、実施例 8 で作製した精製ペプチド抗体を用いて行った。ヒト非小細胞肺癌由来 NCI-H358 細胞 1.5×10^6 個を 10% 牛胎仔血清 (JRH 社) を含む RPMI-1640 培地 (Invitrogen 社) 10 ml に懸濁し、直径 10cm のペトリディッシュに播種した。5% 炭酸ガス気流下、37℃

20 で一晩培養した。実施例 6 で作製したプラスミド pCMV-14- SEMA4B $6 \mu\text{g}$ と Plus 試薬 (Invitrogen 社) および OPTI-MEM I (Invitrogen 社) とを混合し、室温で 15 分間放置した後、LipofectAMINE トランスフェクション試薬 (Invitrogen 社) および OPTI-MEM I を添加し、さらに室温で 15 分間放置した。この混合液を培養液に滴下して培養を継続した。発現プラスミド導入 2 日

25 後に細胞を氷冷した PBS で洗浄し、氷冷した RIPA 緩衝液 [50mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5、150 mM 塩化ナトリウム、1% Triton X-100、0.1% SDS、1% デオキシコール酸、Complete™ タブレット (Roche Diagnostics 社)、Phosphatase Inhibitor Cocktail-2 (Sigma 社)] 1ml を添加し 4℃ で 30 分間放置した。この RIPA 緩衝液を回収し、15,000rpm で 20 分間遠心分離した上澄

液を無細胞抽出液とした。この無細胞抽出液および2倍濃度 SDS-PAGE 用サンプルバッファー〔125mM トリス・塩酸緩衝液、pH6.8、40%グリセロール、4% SDS、0.04%プロモフェノールブルーおよび5% 2-メルカプトエタノール〕を等容量で混合し、95℃で5分間加熱した後、10 μ lを10%アクリルアミドゲル
5 での SDS-PAGE に供した。泳動分離したタンパク質は、常法に従いクリアプロット P 膜 (ATTO 社) に転写した後、ブロッキング溶液〔50mM トリス・塩酸緩衝液、pH 7.5、500 mM 塩化ナトリウム、0.1% Tween 20、5%スキムミルク〕中に1時間室温放置した。次に、実施例8で作製したペプチド抗体 AS-2531、AS-2532、AS-2591 または AS-2592 を、3 μ g/ml の濃度となるようブロッキング
10 溶液で希釈し、4℃にて一晩反応させた。続いて、ブロッキング溶液で5万倍または10万倍に希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham-Bioscience 社) 中で1時間室温放置した。検出には ECL plus (Amersham-Bioscience 社) を用い、添付プロトコールに従い SEMA4B タンパク質を検出した。

AS-2531 を除き、AS-2532、AS-2591 および AS-2592 のいずれを用いた場合でも、分子量 100kD 近傍の位置に SEMA4B タンパク質に由来する特異的なバンド
15 が認められた。

実施例 10

ウサギペプチド抗体を用いた免疫沈降

20 実施例8で作製した精製ペプチド抗体を用いて、SEMA4B タンパク質の免疫沈降を非変性状態にて行った。

実施例7で得たプラスミド pCMV-14-SEMA4B-3xFLAG を用いて、実施例9と同様の操作で無細胞抽出液を調製した。Protein G-Sepharose 4FF (Amersham-Bioscience 社) を等容量の RIPA 緩衝液で懸濁した懸濁液 50 μ l に無細胞抽出
25 液 400 μ l を加え、さらに実施例8記載のペプチド抗体 AS-2531、AS-2532、AS-2591 または AS-2592 のいずれか一つを 5 μ g 加えた混合液を調製し、4℃にて一晩攪拌した。Protein G-Sepharose 4FF 共沈殿画分を RIPA 緩衝液にて洗浄後、50 μ l の SDS-PAGE 用サンプルバッファー〔62.5mM トリス・塩酸緩衝液、pH6.8、20%グリセロール、2%SDS、0.02%プロモフェノールブルーおよび

- 2.5% 2-メルカプトエタノール] に懸濁し、95℃で5分間加熱した後、5 μ l または10 μ l を10%アクリルアミドゲルでのSDS-PAGEに供した。検出は実施例9記載の方法に準拠した。但し、マウス抗FLAG M2抗体(Sigma社)をブロッキング溶液で0.2 μ g/ml または0.1 μ g/ml となるように希釈したものを一次抗体として、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham- Bioscience 社) をブロッキング溶液で2.5万倍または5万倍に希釈したものを二次抗体として用いた。

ペプチド抗体 AS-2531、AS-2532、AS-2591 および AS-2592 のいずれを用いて免疫沈降を行った場合にも、分子量 100kD 近傍に SEMA4B タンパク質に由来する特異的なバンドが認められた。

- 10 これより、ペプチド抗体 AS-2531、AS-2532、AS-2591 および AS-2592 は、未変性の SEMA4B タンパク質と結合することが明らかとなった。

実施例 11

癌細胞株における SEMA4B タンパク質の発現検討

- 15 肺癌細胞株 NCI-H2228、NCI-H1651、NCI-H358、NCI-H23 ならびに NCI-H1703 ; 卵巣癌細胞株 SKOV-3 ならびに TOV-21G ; 前立腺癌細胞株 DU145 ; および膵癌細胞株 PANC-1 を、直径 10cm のペトリディッシュ 2 枚で培養した。各々の細胞についてペトリディッシュ 1 枚分をトリプシン・EDTA (Invitrogen 社) で分散し、細胞数を計測した。計測した細胞数を基にして、5 \times 10⁶ 個の細胞に対して 1 ml の割合で氷冷 RIPA 緩衝液 (実施例 9 に記載) を残りのペトリディッシュ 1 枚に添加し、4℃で 30 分間放置した。この RIPA 緩衝液を回収し、15,000rpm で 20 分間遠心分離した上澄液を無細胞抽出液とした。一方、SizeTM X ProteinG Immunoprecipitation Kit (Pierce 社) の添付プロトコールに従い実施例 8 記載のペプチド抗体 AS-2531 を ProteinG-Sepharose 4FF
- 25 (Amersham-Bioscience 社) に架橋した樹脂を用意し、等容量の RIPA 緩衝液で懸濁した。この懸濁液 30 μ l に前述の無細胞抽出液 400 μ l を加え、4℃にて一晩攪拌を行った。ProteinG-Sepharose 4FF 共沈殿画分を RIPA 緩衝液にて洗浄後、実施例 10 記載の SDS-PAGE 用サンプルバッファー 30 μ l に懸濁し 95℃で 5 分間加熱した後、20 μ l を 10%アクリルアミドゲルでの SDS-PAGE に供し

た。検出はペプチド抗体 AS-2532 を用いて実施例 9 記載の方法に準じて行った。

上記 9 種類の細胞株の中で、NCI-H2228、NCI-H358、NCI-H23、SKOV-3、
DU145 および PANC-1 の各細胞株において、分子量 100kD 近傍に、SEMA4B タン
パク質に由来する特異的なバンドが認められた。これより、SEMA4B タンパク
5 質が、上記 6 種類の癌細胞株で高発現していることが明らかとなった。

実施例 1 2

組換え型完全長タンパク質安定発現細胞株の樹立

ヒト非小細胞肺癌由来 NCI-H358 細胞 2.0×10^5 個を 10% 牛胎仔血清 (JRH
10 社)、1mM ピルビン酸ナトリウムおよび 25mM HEPES を含む RPMI-1640 培地
(Invitrogen 社) 2 ml に懸濁し、6 ウェルプレートに播種した後、5% 炭酸ガ
ス気流下、37℃で一晩培養した。一方、OPTI-MEM I (Invitrogen 社) で希釈
した実施例 6 記載のプラスミド pCMV-14-SEMA4B 1 μ g を Plus 試薬
(Invitrogen 社) 6 μ l と混合し室温で 15 分間放置した後、OPTI-MEM I で希
15 釈した LipofectAMINE トランスフェクション試薬 (Invitrogen 社) 4 μ l を添
加し、さらに室温で 15 分間放置した。この混合液を培養液に滴下してさらに
1 日培養を継続した後、トリプシン・EDTA (Invitrogen 社) で細胞を分散し、
上記の培養培地に G418 (プロメガ社) を 400 μ g/ml となるように加えた培地
で 10 倍に希釈して 24 ウェルプレートに播種した。3 日または 4 日ごとに G418
20 を含む上記培地 (G418 選択培地) を交換しながら 5% 炭酸ガス気流下、37℃で
培養を継続した。1 個~3 個の細胞が増殖しコロニーを形成したウェルから細
胞を回収し、48 ウェルプレートの 2 ウェルに等しく播種した。細胞密度が
50% 以上になるまで培養を継続した後、1 ウェル分の細胞に実施例 1 0 記載の
SDS-PAGE 用サンプルバッファー 50 μ l を加え、細胞溶解液を調製した。95℃
25 で 5 分間加熱処理した後、5 μ l を 10% アクリルアミドゲルでの SDS-PAGE に供
した。実施例 9 で記載した方法に準じ、ペプチド抗体 AS-2532 を用いてウエス
タンブロットティングを行い、SEMA4B タンパク質 (配列番号: 1) を構成的に
発現する安定発現細胞を探索した。もう一方のウェルから回収した細胞を、1
ウェルあたり 0.7 個となるように希釈後、96 ウェルプレートに播種した。

- G418 選択培地を 3 日あるいは 4 日ごとに交換しながら細胞密度が 50% 程度になるまで、5% 炭酸ガス気流下、37℃で培養を継続した。再び、48 ウェルプレート
- の 2 ウェルに等しく播種し、細胞密度が 50% 以上になるまで培養を継続し、1 ウェル分の細胞から調製した細胞溶解液を用いて、上記と同様にウエスタンブロッティングを行った。SEMA4B タンパク質（配列番号：1）を最も高
- 5 発現するクローンを選び、SEMA4B 安定発現細胞株 SEMA4B/H358 を得た。

実施例 1 3

SEMA4B タンパク質の局在性検討（ビオチン標識）

- 10 ヒト非小細胞肺癌細胞株 NCI-H2228 ならびに NCI-H358、および実施例 1 2 で作製した組換え型完全長タンパク質の安定発現細胞株（SEMA4B/H358）を用いて、細胞表層上に露出しているタンパク質を Cellular Labeling and Immunoprecipitation Kit（Roche Diagnostics 社）を用いてビオチン標識した。続いて、実施例 9 の方法に従い調製した無細胞抽出液 1ml と実施例 8 で作
- 15 製したペプチド抗体 AS-2591 5 μ g とを用いて、実施例 1 0 の方法に従って免疫沈降し SDS-PAGE を行った。HRP 標識したストレプトアビジン（Amersham-Bioscience 社）を用いて検出したところ、分子量 100 k D 近傍に SEMA4B タンパク質に由来するバンドが認められ、SEMA4B タンパク質、SEMA4B-M1 タンパク質、SEMA4B-M2 タンパク質および SEMA4B-M3 タンパク質が細胞表面上に局在し
- 20 ていることが明らかとなった。

実施例 1 4

SEMA4B タンパク質の局在性検討（FACS 解析）

- 25 ヒト非小細胞肺癌細胞株 NCI-H2228 ならびに NCI-H358、および実施例 1 2 に記載した SEMA4B/H358 を、直径 10cm のペトリディッシュにそれぞれ播種し、サブコンフルエントになるまで培養した。各細胞を PBS で洗浄後、0.5% BSA および 5mM EDTA を含む PBS を加え室温で 15 分間放置し、細胞を分散した。次に、緩衝液 A [2% 牛胎仔血清（JRH 社）および 0.1% アジ化ナトリウムを含む HBSS（Hanks' Balanced Salt Solutions、Invitrogen 社）] で 4×10^6 個/ml

の濃度になるように細胞を懸濁し、終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ となるよう AS-2532 または非免疫ウサギ IgG (Jackson 社) を加え、氷中に 3 時間放置した。緩衝液 A で細胞を洗浄後、 $10 \mu\text{g/ml}$ の Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes 社) を含む緩衝液 A で懸濁し、氷上にて 2 時間放置した。緩衝液 A で
5 再び洗浄後、FACScan (BD バイオサイエンス社) にて解析した。その結果、いずれの細胞においてもウサギペプチド抗体 AS-2532 特異的に染色され、SEMA4B タンパク質、SEMA4B-M1 タンパク質、SEMA4B-M2 タンパク質および SEMA4B-M3 タンパク質が細胞表面上に局在していることが明らかとなった。

10 実施例 15

アンチセンスオリゴヌクレオチド導入によるヒト非小細胞肺癌細胞株 NCI-H358 のアポトーシス誘導

実施例 2 に記載の NCI-H1703 以外のヒト非小細胞肺癌細胞株においてもアンチセンスオリゴヌクレオチド導入によりアポトーシスが誘発されるか否かを検討した。
15

10% 牛胎仔血清 (JRH 社)、 1mM ビルビン酸ナトリウムおよび 25mM HEPES を含む RPMI-1640 培地 (Invitrogen 社) で NCI-H358 を懸濁し、1 ウェル当たり 8×10^3 個の細胞密度 (培地液量 $80 \mu\text{l}$) となるよう、NCI-H358 を 96 穴平底組織培養プレート (BD フェルコン社) に播種し、5% 炭酸ガス気流中、 37°C で
20 一晚培養した。一方、実施例 2 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 13) およびコントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 14) 各 $0.06 \mu\text{g}$ を OPTI-MEM I (Invitrogen 社) で希釈し、Plus 試薬 (Invitrogen 社) $0.5 \mu\text{l}$ と混合した後、室温で 15 分間放置した。OPTI-MEM I で希釈した LipofectAMINE トランスフェクション試薬 (Invitrogen 社) $0.4 \mu\text{l}$ を加え、
25 さらに室温で 15 分間放置した。この混合液全量を NCI-H358 の培養液に添加し 3 日間培養を継続した後、Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics 社) および Caspase-Glo 3/7 assay (Promega 社) の添付プロトコルに従い、上記オリゴヌクレオチドのアポトーシス誘導活性を測定した。
その結果、NCI-H358 においては、Cell Death Detection ELISA^{PLUS} および

Caspase-Glo 3/7 assay とともに、アンチセンスオリゴヌクレオチドは陰性対象として用いたコントロールオリゴヌクレオチドに比べ、それぞれ1.42 倍および1.77 倍のアポトーシス誘導活性を示し、統計学的に有意な差 ($P \leq 0.01$) を示した (表5 および表6)。

5

〔表5〕

	アポトーシス誘導活性 ($A_{405} - A_{492}$)	
	平均値	標準偏差
ブランク	0. 2 1 7	0. 0 0 7
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 4)	0. 3 3 0	0. 0 4 1
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 3)	0. 4 6 7	0. 0 2 9

〔表6〕

	アポトーシス誘導活性 (CPS)	
	平均値	標準偏差
ブランク	7 6 2 5	2 3 5
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 4)	8 7 2 7	1 8 8
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 3)	1 5 4 5 2	5 7 0

10 実施例 1 6

アンチセンスオリゴヌクレオチド導入によるヒト非小細胞肺癌細胞株 NCI-H2228、NCI-H1651 および NCI-H23 のアポトーシス誘導

NCI-H1703 (実施例 2) および NCI-H358 (実施例 1 5) 以外のヒト非小細胞肺癌細胞株においても、アンチセンスオリゴヌクレオチド導入によりアポトーシスが誘発されるか否かを検討した。

15

NCI-H2228 には、10%牛胎仔血清 (JRH 社)、1mM ピルビン酸ナトリウムおよび 25mM HEPES を含む RPMI-1640 培地 (Invitrogen 社) を用いた。NCI-H1651 には、10%FBS を含む ACL-4 培地 (ATCC) を用いた。NCI-H23 には、10%牛胎仔血清 (JRH 社) および 25mM HEPES を含む RPMI-1640 培地

(Invitrogen 社) を用いた。各細胞をそれぞれの培地に懸濁し、1 ウェル当たり 7.5×10^3 個 (NCI-H2228)、 7.5×10^3 個 (NCI-H1651) および 5×10^3 個 (NCI-H23) の細胞密度 (培地液量 $125 \mu\text{l}$) となるよう 96 穴平底組織培養プレート (BD ファルコン社) に播種し、5% 炭酸ガス気流中、 37°C で一晩培養した。

- 5 一方、実施例 2 記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 13) およびコントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 14) 各 $0.135 \mu\text{g}$ を OPTI-MEM I (Invitrogen 社) で希釈し、Plus 試薬 (Invitrogen 社) $0.75 \mu\text{l}$ と混合した後、室温で 15 分間放置した。OPTI-MEM I で希釈した
- 10 LipofectAMINE トランスフェクション試薬 (Invitrogen 社) $0.4 \mu\text{l}$ を加え、さらに室温で 15 分間放置した。この混合液全量を各細胞の培養液に添加し 3 日間培養を継続した後、Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics 社) の添付プロトコールに従い上記オリゴヌクレオチドのアポトーシス誘導活性を測定した。

- その結果、いずれの細胞株においても、アンチセンスオリゴヌクレオチドは
- 15 陰性対象として用いたコントロールオリゴヌクレオチドに比べ、それぞれ 1.58 倍 (NCI-H2228)、1.21 倍 (NCI-H1651) および 1.25 倍 (NCI-H23) のアポトーシス誘導活性を示し、危険率は $P \leq 0.05$ (NCI-H2228)、 $P \leq 0.05$ (NCI-H1651) および $P \leq 0.01$ (NCI-H23) と算出され、統計学的に有意な差を示した (表 7、表 8 および表 9)。

20

〔表 7〕

	アポトーシス誘導活性 ($A_{405} - A_{492}$)	
	平均値	標準偏差
ブランク	0. 3 1 2	0. 0 0 9
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 14)	0. 5 2 6	0. 0 4 3
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 13)	0. 8 2 9	0. 1 2 3

〔表 8〕

	アポトーシス誘導活性 ($A_{405} - A_{492}$)	
	平均値	標準偏差
ブランク	0. 5 2 3	0. 0 9 1
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 4)	1. 1 5 2	0. 1 0 1
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 3)	1. 3 9 0	0. 1 0 4

〔表 9〕

	アポトーシス誘導活性 ($A_{405} - A_{492}$)	
	平均値	標準偏差
ブランク	0. 6 7 8	0. 0 2 8
コントロールオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 4)	1. 0 8 1	0. 0 5 0
アンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号: 1 3)	1. 3 5 1	0. 0 5 8

5 実施例 1 7

ウサギペプチド抗体を用いたアポトーシス誘発

ヒト非小細胞肺癌細胞株 NCI-H2228 を実施例 8 で取得したウサギペプチド抗体 AS-2531 および AS-2532 で処理し、これらウサギペプチド抗体のアポトーシス誘導活性を測定した。

- 10 NCI-H2228 を、10%牛胎仔血清 (JRH 社)、1mM ピルビン酸ナトリウムおよび 25mM HEPES を含む RPMI-1640 培地 (Invitrogen 社) に懸濁し、1 ウェル当たり 4×10^3 個の細胞密度になるよう I 型コラーゲンをコートした 96 穴平底組織培養プレート (BD ファルコン社) に播種し、5%炭酸ガス気流中、37℃で一晩培養した。実施例 8 で取得したウサギペプチド抗体 AS-2531、AS-2532、および非免疫ウサギ IgG (Jackson 社) を PBS で希釈し、各抗体について終濃度が 15 $\mu\text{g/ml}$ 、45 $\mu\text{g/ml}$ および 150 $\mu\text{g/ml}$ となるよう培養液にそれぞれ添加した。さらに 5 日間培養を継続した後、Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Diagnostics 社) の添付プロトコールに従い、上記ウサギペプチド抗体のアポトーシス誘導活性を測定した。

その結果、 $45 \mu\text{g/ml}$ および $15 \mu\text{g/ml}$ の AS-2531 存在下では、同濃度の非免疫ウサギ IgG に比べ、1.26 倍および 1.31 倍のアポトーシス誘導活性を示した ($P \leq 0.05$ および $P \leq 0.01$)。また、 $150 \mu\text{g/ml}$ の AS-2532 存在下では、同濃度の非免疫ウサギ IgG に比べ、1.27 倍のアポトーシス誘導活性を示した ($P \leq 0.01$)。

このように、SEMA4B タンパク質、SEMA4B-M1 タンパク質、SEMA4B-M2 タンパク質および SEMA4B-M3 タンパク質は、ヒト肺癌細胞の生存維持に重要な働きをしていることが明らかとなった。

10 産業上の利用可能性

本発明で用いられるタンパク質は、癌細胞に特異的に発現し、癌の診断マーカーである。したがって、該タンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、該タンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド、本発明の抗体は、例えば、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、アポトーシス促進（誘導）剤などとして安全に使用することができる。また、本発明で用いられるタンパク質またはそれをコードするポリヌクレオチド、本発明の抗体などは、癌（例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など）の予防・治療剤、アポトーシス促進（誘導）剤などのスクリーニングに有用である。

請求の範囲

1. 配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
5
2. 配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。
3. 請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
4. 請求項1記載のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
10
5. DNAである請求項4記載のポリヌクレオチド。
6. 配列番号：5、配列番号：8または配列番号：11で表される塩基配列を含有する請求項5記載のポリヌクレオチド。
7. 配列番号：5、配列番号：8または配列番号：11で表される塩基配列からなるポリヌクレオチド。
15
8. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
9. 請求項8記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
10. 請求項9記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のタンパク質またはその部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項1記載のタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩の製造法。
20
11. 請求項1記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。
12. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。
13. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。
14. 請求項1記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
25
15. 請求項14記載の抗体を含有してなる医薬。
16. 請求項14記載の抗体を含有してなる診断薬。
17. 請求項4記載のポリヌクレオチドに相補的または実質的に相補的な塩

基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド。

18. 請求項17記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

19. 請求項14記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載のタンパク質の定量方法。

5 20. 請求項19記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のタンパク質またはその機能が関連する疾患の診断方法。

21. 請求項1記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、請求項1記載のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

10 22. 請求項1記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、請求項1記載のタンパク質の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

23. 請求項4記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項1記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

15 24. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有してなる、請求項1記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

20 25. 癌の予防・治療剤である請求項11、請求項12、請求項15または請求項18記載の医薬。

26. アポトーシス促進剤である請求項11、請求項12、請求項15または請求項18記載の医薬。

27. 癌の診断薬である請求項13または請求項16記載の診断薬。

25 28. 請求項1記載のタンパク質もしくはその部分ペプチドの発現または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する物質を含有してなるアポトーシス促進剤。

29. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなるアポトーシス促進剤。

30. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一の

アミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体を含有してなる癌の予防・治療剤。

5 3 1. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するポリヌクレオチド。

3 2. 請求項3 1記載のポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

3 3. アポトーシス促進剤である請求項3 2記載の医薬。

10 3 4. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング方法。

15 3 5. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有することを特徴とするアポトーシス促進剤のスクリーニング用キット。

3 6. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドの発現または該タンパク質の遺伝子の発現を阻害する物質を含有してなるアポトーシス促進剤。

20 3 7. 哺乳動物に対し、(i) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する物質、(ii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する物質、または (iii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の有効量を投与することを特徴とする、癌の予防・治療法。

25 3 8. 哺乳動物に対し、(i) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発

現を阻害する物質、(ii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する物質、または (iii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の有効量を投与することを特徴とする、癌細胞のアポトーシス促進方法。

5 39. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する、または該タンパク質もしくはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害することを特徴とする癌の予防・治療法。

10 40. 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する、または該タンパク質もしくはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害することを特徴とする癌細胞のアポトーシス促進方法。

15 41. 癌の予防・治療剤を製造するための (i) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する物質、(ii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する物質、または (iii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用。

20 42. 癌細胞のアポトーシス促進剤を製造するための (i) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：7または配列番号：10で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の発現を阻害する物質、(ii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドの遺伝子の発現を阻害する物質、または (iii) 該タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体の使用。

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel protein and its use

<130> 3132W00P

<150> JP2002-378052

<151> 2002-12-26

<150> JP2003-65497

<151> 2003-3-11

<160> 25

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 837

<212> PRT

<213> Human

$\langle 400 \rangle$ 1

Met Leu Arg Thr Ala Met Gly Leu Arg Ser Trp Leu Ala Ala Pro Trp
5 10 15

Gly Ala Leu Pro Pro Arg Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
20 25 30

Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Pro Thr Trp Ala Leu Ser Pro Arg Ile
35 40 45

Ser Leu Pro Leu Gly Ser Glu Glu Arg Pro Phe Leu Arg Phe Glu Ala
50 55 60

Glu His Ile Ser Asn Tyr Thr Ala Leu Leu Leu Ser Arg Asp Gly Arg
65 70 75 80

Thr Leu Tyr Val Gly Ala Arg Glu Ala Leu Phe Ala Leu Ser Ser Asn
85 90 95

2/36

Leu Ser Phe Leu Pro Gly Gly Glu Tyr Gln Glu Leu Leu Trp Gly Ala
 100 105 110
 Asp Ala Glu Lys Lys Gln Gln Cys Ser Phe Lys Gly Lys Asp Pro Gln
 115 120 125
 Arg Asp Cys Gln Asn Tyr Ile Lys Ile Leu Leu Pro Leu Ser Gly Ser
 130 135 140
 His Leu Phe Thr Cys Gly Thr Ala Ala Phe Ser Pro Met Cys Thr Tyr
 145 150 155 160
 Ile Asn Met Glu Asn Phe Thr Leu Ala Arg Asp Glu Lys Gly Asn Val
 165 170 175
 Leu Leu Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro Asn Phe Lys
 180 185 190
 Ser Thr Ala Leu Val Val Asp Gly Glu Leu Tyr Thr Gly Thr Val Ser
 195 200 205
 Ser Phe Gln Gly Asn Asp Pro Ala Ile Ser Arg Ser Gln Ser Leu Arg
 210 215 220
 Pro Thr Lys Thr Glu Ser Ser Leu Asn Trp Leu Gln Asp Pro Ala Phe
 225 230 235 240
 Val Ala Ser Ala Tyr Ile Pro Glu Ser Leu Gly Ser Leu Gln Gly Asp
 245 250 255
 Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Phe Phe Ser Glu Thr Gly Gln Glu Phe Glu
 260 265 270
 Phe Phe Glu Asn Thr Ile Val Ser Arg Ile Ala Arg Ile Cys Lys Gly
 275 280 285
 Asp Glu Gly Gly Glu Arg Val Leu Gln Gln Arg Trp Thr Ser Phe Leu
 290 295 300
 Lys Ala Gln Leu Leu Cys Ser Arg Pro Asp Asp Gly Phe Pro Phe Asn
 305 310 315 320
 Val Leu Gln Asp Val Phe Thr Leu Ser Pro Ser Pro Gln Asp Trp Arg

3/36

325	330	335
Asp Thr Leu Phe Tyr Gly Val Phe Thr Ser Gln Trp His Arg Gly Thr		
340	345	350
Thr Glu Gly Ser Ala Val Cys Val Phe Thr Met Lys Asp Val Gln Arg		
355	360	365
Val Phe Ser Gly Leu Tyr Lys Glu Val Asn Arg Glu Thr Gln Gln Met		
370	375	380
Val His Arg Asp Pro Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly Ala Cys Ile		
385	390	395
Thr Asn Ser Ala Arg Glu Arg Lys Ile Asn Ser Ser Leu Gln Leu Pro		
405	410	415
Asp Arg Val Leu Asn Phe Leu Lys Asp His Phe Leu Met Asp Gly Gln		
420	425	430
Val Arg Ser Arg Met Leu Leu Leu Gln Pro Gln Ala Arg Tyr Gln Arg		
435	440	445
Val Ala Val His Arg Val Pro Gly Leu His His Thr Tyr Asp Val Leu		
450	455	460
Phe Leu Gly Thr Gly Asp Gly Arg Leu His Lys Ala Val Ser Val Gly		
465	470	475
Pro Arg Val His Ile Ile Glu Glu Leu Gln Ile Phe Ser Ser Gly Gln		
485	490	495
Pro Val Gln Asn Leu Leu Leu Asp Thr His Arg Gly Leu Leu Tyr Ala		
500	505	510
Ala Ser His Ser Gly Val Val Gln Val Pro Met Ala Asn Cys Ser Leu		
515	520	525
Tyr Arg Ser Cys Gly Asp Cys Leu Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala		
530	535	540
Trp Ser Gly Ser Ser Cys Lys His Val Ser Leu Tyr Gln Pro Gln Leu		
545	550	555
		560

4/36

Ala Thr Arg Pro Trp Ile Gln Asp Ile Glu Gly Ala Ser Ala Lys Asp
565 570 575

Leu Cys Ser Ala Ser Ser Val Val Ser Pro Ser Phe Val Pro Thr Gly
580 585 590

Glu Lys Pro Cys Glu Gln Val Gln Phe Gln Pro Asn Thr Val Asn Thr
595 600 605

Leu Ala Cys Pro Leu Leu Ser Asn Leu Ala Thr Arg Leu Trp Leu Arg
610 615 620

Asn Gly Ala Pro Val Asn Ala Ser Ala Ser Cys His Val Leu Pro Thr
625 630 635 640

Gly Asp Leu Leu Leu Val Gly Thr Gln Gln Leu Gly Glu Phe Gln Cys
645 650 655

Trp Ser Leu Glu Glu Gly Phe Gln Gln Leu Val Ala Ser Tyr Cys Pro
660 665 670

Glu Val Val Glu Asp Gly Val Ala Asp Gln Thr Asp Glu Gly Gly Ser
675 680 685

Val Pro Val Ile Ile Ser Thr Ser Arg Val Ser Ala Pro Ala Gly Gly
690 695 700

Lys Ala Ser Trp Gly Ala Asp Arg Ser Tyr Trp Lys Glu Phe Leu Val
705 710 715 720

Met Cys Thr Leu Phe Val Leu Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Phe Leu
725 730 735

Leu Tyr Arg His Arg Asn Ser Met Lys Val Phe Leu Lys Gln Gly Glu
740 745 750

Cys Ala Ser Val His Pro Lys Thr Cys Pro Val Val Leu Pro Pro Glu
755 760 765

Thr Arg Pro Leu Asn Gly Leu Gly Pro Pro Ser Thr Pro Leu Asp His
770 775 780

Arg Gly Tyr Gln Ser Leu Ser Asp Ser Pro Pro Gly Ser Arg Val Phe

5/36

785	790	795	800
Thr Glu Ser Glu Lys Arg Pro Leu Ser Ile Gln Asp Ser Phe Val Glu			
805	810	815	
Val Ser Pro Val Cys Pro Arg Pro Arg Val Arg Leu Gly Ser Glu Ile			
820	825	830	
Arg Asp Ser Val Val			
835			

<210> 2

<211> 2511

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

```

atgctgcgca ccgcgatggg cctgaggagc tggctcgccg ccccatgggg cgcgctgccg    60
cctcggccac cgctgctgct gctcctgctg ctgctgctcc tgcctgcagcc gccgcctccg    120
acctggggcgc tcagcccccg gatcagcctg cctctgggct ctgaagagcg gccattcctc    180
agattcgaag ctgaacacat ctccaactac acagcccttc tgcctgagcag ggatggcagg    240
accctgtacg tgggtgctcg agaggccctc ttgtcactca gtagcaacct cagcttccctg    300
ccaggcgggg agtaccagga gctgctttgg ggtgcagacg cagagaagaa acagcagtgc    360
agcttcaagg gcaaggaccc acagcgcgac tgtcaaaact acatcaagat cctcctgccg    420
ctcagcggca gtcacctgtt cacctgtggc acagcagcct tcagccccat gtgtacctac    480
atcaacatgg agaacttcac cctggcaagg gacgagaagg ggaatgtcct cctggaagat    540
ggcaagggcc gttgtccctt cgaccggaat ttcaagtcca ctgccctggt ggttgatggc    600
gagctctaca ctggaacagt cagcagcttc caagggaatg acccggccat ctgcgaggagc    660
caaagccttc gccccaccaa gaccgagagc tccttcaact ggctgcaaga cccagctttt    720
gtggcctcag cctacattcc tgagagcctg ggcagcttgc aaggcgatga tgacaagatc    780
tactttttct tcagcgagac tggccaggaa tttagattct ttgagaacac catttgtgtcc    840
cgcatgtccc gcattctgaa gggcgatgag ggtggagagc gggctgctaca gcagcgctgg    900
acctccttcc tcaaggccca gctgctgtgc tcacggcccc acgatggctt ccccttcaac    960

```

gtgctgcagg atgtcttcac gctgagcccc agccccagg actggcgtga cacccttttc 1020
 tatggggctt tcacttccca gtggcacagg ggaactacag aaggctctgc cgtctgtgtc 1080
 ttacaaatga aggatgtgca gagagtcttc agcggcctct acaaggaggt gaaccgtgag 1140
 acacagcaga tggtagaccg tgaccacccc gtagccacac cccggcctgg agcgtgcatc 1200
 accaacagtg cccgggaaag gaagatcaac tcatccctgc agctcccaga ccgctgtgtg 1260
 aactttctca aggaccactt cctgatggac gggcaggtcc gaagccgcat gctgtgtgtg 1320
 cagccccagg ctgcctacca gcgcgtggct gtacaccgcg tccctggcct gcaccacacc 1380
 tacgatgtcc tcttcttggg cactgggtgac ggccggctcc acaaggcagt gagcgtgggc 1440
 ccccggtgtc acatcattga ggagctgcag atctttctat cgggacagcc cgtgcagaat 1500
 ctgctcctgg acaccacag ggggctgtgt tatgcggcct cacactcggg cgtagtccag 1560
 gtgcccattg ccaactgcag cctgtaccgg agctgtgggg actgcctcct cgcccgggac 1620
 ccctactgtg ctggagcgg ctccagctgc aagcacgtca gcctctacca gcctcagctg 1680
 gccaccagcg cgtggatcca ggacatcgag ggagccagcg ccaaggacct ttgcagcgcg 1740
 tcttcggttg tgtcccgctc ttttgtacca acaggggaga agccatgtga gcaagtccag 1800
 ttccagccca acacagtga cactttggcc tgcccgctcc tctccaacct ggcgaccgga 1860
 ctctggctac gcaacggggc ccccgctaat gcctcggcct cctgccacgt gctaccact 1920
 ggggacctgc tgcgtgtggg caccacacag ctgggggagt tccagtgtgt gtcactagag 1980
 gagggcttcc agcagctggt agccagctac tgcccagagg tggtaggagga cggggtggca 2040
 gaccaaacag atgagggtgg cagtgtacct gtcattatca gcacatcgcg tgtgagtga 2100
 ccagctggtg gcaaggccag ctggggtgca gacaggctct actggaagga gttcctggtg 2160
 atgtgcacgc tctttgtgtt ggccgtgtgt ctcccagttt tattctgtgt ctaccggcac 2220
 cggaacagca tgaagtcctt cctgaagcag ggggaatgtg ccagcgtgca cccaagacc 2280
 tgccctgttg tgcgtcccc tgagaccgcg ccaactcaac gcctagggcc ccctagcacc 2340
 ccactcgatc accgagggtg ccagtcctgt tcagacagcc ccccggggtc ccgagtcctc 2400
 actgagtcag agaagaggcc actcagcatc caagacagct tcgtggaggt atccccagt 2460
 tgccccggc cccgggtccg ccttggtctg gagatccgtg actctgtgtt g 2511

<210> 3

<211> 3766

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

gctctgcca agccgaggct gcggggccgg cgcggcgagg aggactgcgg tgccccgcgg 60
aggggctgag ttgtccaggg cccacttgac cctgtttccc acctcccgc cccaggtcc 120
ggaggcgggg gccccgggg cgactcgggg gcggaccgcg gggcggagct gccgcccgtg 180
agtccggccg agccacciga gcccagaccg cgggacaccg tcgctcctgc tctccgaatg 240
ctgcgcaccg cgatgggcct gaggagctgg ctgcgcgcc catggggcgc gctgccgcct 300
cggccaccgc tgcgtctgct cctgctgctg ctgctcctgc tgcagccgcc gcctccgacc 360
tgggcgctca gccccggat cagcctgcct ctgggctctg aagagcggcc attcctcaga 420
ttcgaagctg aacacatctc caactacaca gcccttctgc tgagcaggga tggcaggacc 480
ctgtacgtgg gtgctcgaga ggccctcttt gcactcagta gcaacctcag ctctctgcca 540
ggcggggagt accaggagct gccttggggg gcagacgcag agaagaaaca gcagtgcagc 600
ttcaaggga aggaccaca gcgcgactgt caaaactaca tcaagatcct cctgccgctc 660
agcggcagtc acctgttcac ctgtggcaca gcagccttca gcccattgtg tacctacatc 720
aacatggaga acttcacctt ggcaaggga gagaaaggga atgtcctcct ggaagatggc 780
aagggccgtt gtcccttcga cccgaatttc aagtcactg ccctgggtgt tgatggcgag 840
ctctacactg gaacagtcag cagcttccaa gggaatgacc cggccatctc gcggagccaa 900
agccttcgcc ccaccaagac cgagagctcc ctcaactggc tgcaagacc agcttttgtg 960
gcctcagcct acattcctga gagcctgggc agcttgcaag gcgatgatga caagatctac 1020
tttttcttca gcgagactgg ccaggaattt gatttctttg agaacaccat tgtgtcccgc 1080
attgcccga tctgcaaggg cgatgagggt ggagagcggg tgctacagca gcgctggacc 1140
tccttcttca aggcccagct gctgtgctca cggcccgacg atggcttccc ctcaacgtg 1200
ctgcaggatg tcttcacgt gagccccagc cccaggact ggctgacac ccttttctat 1260
ggggtcttca ctcccagtg gcacagggga actacagaag gctctgccgt ctgtgtcttc 1320
acaatgaagg atgtgcagag agtcttcagc ggctctaca aggaggigaa ccgtgagaca 1380
cagcagatgg tacaccgtga cccaccgtg cccacacccc ggcttgagc gtgcatcacc 1440
aacagtgcc gggaaaggaa gatcaactca tccctgcagc tcccagaccg cgtgtgaac 1500
tttctcaagg accatttct gatggacggg caggctccga gccgcatgct gctgtgcag 1560

ccccaggctc gctaccagcg cgtggctgta caccgcgtcc ctggcctgca ccacacctac 1620
gatgtcctct tccitgggcac tggtagcggc cggctccaca aggcagttag cgtggggccc 1680
cgggtgcaca tcattgagga gctgcagatc ttctcatcgg gacagcccgt gcagaatctg 1740
ctcctggaca cccacagggg gctgctgtat gcggcctcac actcgggcgt agtccagggtg 1800
cccatggcca actgcagcct gtaccggagc tgtggggact gcctcctcgc ccgggacccc 1860
tactgtgctt ggagcggctc cagctgcaag cacgtcagcc tctaccagcc tcagctggcc 1920
accaggccgt ggatccagga catcgaggga gccagcgcca aggaccttg cagcgcgtct 1980
tcggtttgtt ccccgctttt tgtaccaaca ggggagaagc catgtgagca agtccagttc 2040
cagcccaaca cagtgaacac ttitggcctgc ccgtcctct ccaacctggc gacccgactc 2100
tggctacgca acggggcccc cgtcaatgcc tggcctcct gccacgtgt acccactggg 2160
gacctgtgc tggtaggcac ccaacagctg ggggagttcc agtctgtgt actagaggag 2220
ggcttccagc agctggtagc cagctactgc ccagagggtg tggaggacgg ggtggcagac 2280
caaacagatg agggtaggcag tgtaccgctc attatcagca catcgctgt gagtgcacca 2340
gctggtaggc aggccagctg ggtgcagac aggtcctact ggaaggagtt cctggtagt 2400
tgcacgtct ttgtgtgtgc cgtgtgtc ccagttttat tctgtctta ccggcaccgg 2460
aacagcatga aagtcttct gaagcagggg gaatgtgcca gcgtgcaccc caagacctgc 2520
cctgtgtgtc tggccctga gaccgcccc ctcaacggcc tagggcccc tagcaccaca 2580
ctcgatcacc gaggtacca gtccctgtca gacagcccc cggggtcccg agtcttact 2640
gagtcagaga agaggccact cagcatcaa gacagcttcg tggaggtatc cccagtgtgc 2700
ccccggcccc ggtccgct tggctcggag atccgtgact ctgtgtgtg agagctgact 2760
tccagaggac gctgccctgg ctccagggc tgtgaatgt cggagagggt caactggacc 2820
tccctccgc tctgtcttc gtggaacacg accgtgtgtc ccggccctg ggagccttg 2880
ggccagctgg cctgtgtc tccagtcaag tagcgaagct cctaccacc agacaccaa 2940
acagccgtgg cccagaggt cctggccaaa tatgggggc tgcctaggtt ggtggaacag 3000
tgctccttat gtaaactgag cctttgttt aaaaaacaat tccaatgtg aaactagaat 3060
gagaggaag agatagcatg gcatgcagca cacacggctg ctccagttca tggcctccca 3120
gggtgtgtg ggaatcatcc aaagtgtgt tctgagacag agttggaaac cctaccaac 3180
tggcctctc acctccaca ttatcccgt gccaccggct gccctgtct actgcagatt 3240
caggaccagc ttgggtgtc tgcgttctgc ctgcccagc agccgaggat gtagttgtt 3300

9/36

ctgccgtcgt cccaccacct cagggaccag agggctaggt tggcactgcg gccctcacca 3360
 ggtcctgggc tcggacccaa ctcttgacc tticcagcct gtatcaggct gtggccacac 3420
 gagaggacag cgcgagctca ggagagattt cgtgacaatg tacgcctttc cctcagaatt 3480
 caggggaagag actgtgcct gccttcctcc gttgttgcgt gagaaccctg gtgccccttc 3540
 ccaccatata caccctcgct ccatttttga actcaaacac gaggaactaa ctgcaccctg 3600
 gtccctctccc cagtcctccag ttcaccctcc atccctcacc ttccctccact ctaagggata 3660
 tcaacactgc ccagcacagg ggccctgaat ttatgtgggt ttatacatt ttttaataag 3720
 atgcacttta tgcattttt taataaagtc tgaagaatta ctgttt 3766

<210> 4

<211> 837

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Met Leu Arg Thr Ala Met Gly Leu Arg Ser Trp Leu Ala Ala Pro Trp
 5 10 15
 Gly Ala Leu Pro Pro Arg Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 20 25 30
 Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Pro Thr Trp Ala Leu Ser Pro Arg Ile
 35 40 45
 Ser Leu Pro Leu Gly Ser Glu Glu Arg Pro Phe Leu Arg Phe Glu Ala
 50 55 60
 Glu His Ile Ser Asn Tyr Thr Ala Leu Leu Leu Ser Arg Asp Gly Arg
 65 70 75 80
 Thr Leu Tyr Val Gly Ala Arg Glu Ala Leu Phe Ala Leu Ser Ser Asn
 85 90 95
 Leu Ser Phe Leu Pro Gly Gly Glu Tyr Gln Glu Leu Leu Trp Gly Ala
 100 105 110
 Asp Ala Glu Lys Lys Gln Gln Cys Ser Phe Lys Gly Lys Asp Pro Gln

10/36

115 120 125
 Arg Asp Cys Gln Asn Tyr Ile Lys Ile Leu Leu Pro Leu Ser Gly Ser
 130 135 140
 His Leu Phe Thr Cys Gly Thr Ala Ala Phe Ser Pro Met Cys Thr Tyr
 145 150 155 160
 Ile Asn Met Glu Asn Phe Thr Leu Ala Arg Asp Glu Lys Gly Asn Val
 165 170 175
 Leu Leu Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro Asn Phe Lys
 180 185 190
 Ser Thr Ala Leu Val Val Asp Gly Glu Leu Tyr Thr Gly Thr Val Ile
 195 200 205
 Ser Phe Gln Gly Asn Asp Pro Ala Ile Ser Arg Ser Gln Ser Leu Arg
 210 215 220
 Pro Thr Lys Thr Glu Ser Ser Leu Asn Trp Leu Gln Asp Pro Ala Phe
 225 230 235 240
 Val Ala Ser Ala Tyr Ile Pro Glu Ser Leu Gly Ser Leu Gln Gly Asp
 245 250 255
 Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Phe Phe Ser Glu Thr Gly Gln Glu Phe Glu
 260 265 270
 Phe Phe Glu Asn Thr Ile Val Ser Arg Ile Ala Arg Ile Cys Lys Gly
 275 280 285
 Asp Glu Gly Gly Glu Arg Val Leu Gln Gln Arg Trp Thr Ser Phe Leu
 290 295 300
 Lys Ala Gln Leu Leu Cys Ser Arg Pro Asp Asp Gly Phe Pro Phe Asn
 305 310 315 320
 Val Leu Gln Asp Val Phe Thr Leu Ser Pro Ser Pro Gln Asp Trp Arg
 325 330 335
 Asp Thr Leu Phe Tyr Gly Val Phe Thr Ser Gln Trp His Arg Gly Thr
 340 345 350

11/36

Thr Glu Gly Ser Ala Val Cys Val Phe Thr Met Lys Asp Val Gln Arg
 355 360 365
 Val Phe Ser Gly Leu Tyr Lys Glu Val Asn Arg Glu Thr Gln Gln Met
 370 375 380
 Val His Arg Asp Pro Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly Ala Cys Ile
 385 390 395 400
 Thr Asn Ser Ala Arg Glu Arg Lys Ile Asn Ser Ser Leu Gln Leu Pro
 405 410 415
 Asp Arg Val Leu Asn Phe Leu Lys Asp His Phe Leu Met Asp Gly Gln
 420 425 430
 Val Arg Ser Arg Met Leu Leu Leu Gln Pro Gln Ala Arg Tyr Gln Arg
 435 440 445
 Val Ala Val His Arg Val Pro Gly Leu His His Thr Tyr Asp Val Leu
 450 455 460
 Phe Leu Gly Thr Gly Asp Gly Arg Leu His Lys Ala Val Ser Val Gly
 465 470 475 480
 Pro Arg Val His Ile Ile Glu Glu Leu Gln Ile Phe Ser Ser Gly Gln
 485 490 495
 Pro Val Gln Asn Leu Leu Leu Asp Thr His Arg Gly Leu Leu Tyr Ala
 500 505 510
 Ala Ser His Ser Gly Val Val Gln Val Pro Met Ala Asn Cys Ser Leu
 515 520 525
 Tyr Arg Ser Cys Gly Asp Cys Leu Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala
 530 535 540
 Trp Ser Gly Ser Ser Cys Lys His Val Ser Leu Tyr Gln Pro Gln Leu
 545 550 555 560
 Ala Thr Arg Pro Trp Ile Gln Asp Ile Glu Gly Ala Ser Ala Lys Asp
 565 570 575
 Leu Cys Ser Ala Ser Ser Val Val Ser Pro Ser Phe Val Pro Thr Gly

12/36

580	585	590
Glu Lys Pro Cys Glu Gln Val Gln Phe Gln Pro Asn Thr Val Asn Thr		
595	600	605
Leu Ala Cys Pro Leu Leu Ser Asn Leu Ala Thr Arg Leu Trp Leu Arg		
610	615	620
Asn Gly Ala Pro Val Asn Ala Ser Ala Ser Cys His Val Leu Pro Thr		
625	630	635
Gly Asp Leu Leu Leu Val Gly Thr Gln Gln Leu Gly Glu Phe Gln Cys		
645	650	655
Trp Ser Leu Glu Glu Gly Phe Gln Gln Leu Val Ala Ser Tyr Cys Pro		
660	665	670
Glu Val Val Glu Asp Gly Val Ala Asp Gln Thr Asp Glu Gly Gly Ser		
675	680	685
Val Pro Val Ile Ile Ser Thr Ser Arg Val Ser Ala Pro Ala Gly Gly		
690	695	700
Lys Ala Ser Trp Gly Ala Asp Arg Ser Tyr Trp Lys Glu Phe Leu Val		
705	710	715
Met Cys Thr Leu Phe Val Leu Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Phe Leu		
725	730	735
Leu Tyr Arg His Arg Asn Ser Met Lys Val Phe Leu Lys Gln Gly Glu		
740	745	750
Cys Ala Ser Val His Pro Lys Thr Cys Pro Val Val Leu Pro Pro Glu		
755	760	765
Thr Arg Pro Leu Asn Gly Leu Gly Pro Pro Ser Thr Pro Leu Asp His		
770	775	780
Arg Gly Tyr Gln Ser Leu Ser Asp Ser Pro Pro Gly Ser Arg Val Phe		
785	790	795
Thr Glu Ser Glu Lys Arg Pro Leu Ser Ile Gln Asp Ser Phe Val Glu		
805	810	815

13/36

Val Ser Pro Val Cys Pro Arg Pro Arg Val Arg Leu Gly Ser Glu Ile

820

825

830

Arg Asp Ser Val Val

835

<210> 5

<211> 2511

<212> DNA

<213> Human

<400> 5

```

atgctgcgca ccgcgatggg cctgaggagc tggctcgccg ccccatgggg cgcgctgccg      60
cctcggccac cgctgcctgct gctcctgcta ctgctgctcc tgctgcagcc accgccctccg      120
acctggggcg tcagcccccg gatcagcctg cctctgggct ctgaagagcg gccattcctc      180
agattcgaag ctgaacacat ctccaactac acagcccttc tgctgagcag ggatggcagg      240
acctgtacg tgggtgctcg agaggccctc ttgcactca gtagcaacct cagcttccctg      300
ccaggcgggg agtaccagga gctgccttgg ggtgcagacg cagagaagaa acagcagtgc      360
agcttcaagg gcaaggaccc acagcgcgac tgtcaaaact acatcaagat cctcctgccg      420
ctcagcggca gtcacctgtt cacctgtggc acagcagcct tcagccccat gtgtacctac      480
atcaacatgg agaacttcac cctggcaagg gacgagaagg ggaatgtcct cctggaagat      540
ggcaagggcc gttgtccctt cgaccgaat ttcaagtcca ctgccctggg ggttgatggc      600
gagctctaca ctggaacagt catcagcttc caagggaatg acccggccat ctgcgaggagc      660
caaagccttc gccccaccaa gaccgagagc tccctcaact ggctgcaaga cccagctttt      720
gtggcctcag cctacattcc tgagagcctg ggcagcttgc aaggcgatga tgacaagatc      780
tactttttct tcagcgagac tggccaggaa tttagattct ttgagaacac catttgttcc      840
cgcattgccc gcatctgcaa gggcgatgag ggtggagagc ggggtgctaca gcagcgctgg      900
acctccttcc tcaaggccca gctgctgtgc tcacggcccg acgatggctt ccccttcaac      960
gtgctgcagg atgtcttcac gctgagcccc agccccagg actggcgtga cacccttttc     1020
tatggggtct tcaattccca gtggcacagg ggaactacag aaggctctgc cgtctgtgtc     1080
ttcacaatga aggatgtgca gagagtcttc agcggcctct acaaggagggt gaaccgtgag     1140

```

14/36

acacagcaga tggtaacacg tgacccaccc gtgcccacac ccgggcctgg agcgtgcatc 1200
 accaacagtg cccgggaaag gaagatcaac tcatccctgc agtcccaga ccgctgctg 1260
 aactttctca aggaccatt cctgatggac gggcaggctc gaagccgcat gctgctgctg 1320
 cagccccagg ctgctacca gcgcgtggct gtacaccgcg tccctggcct gcaccacacc 1380
 tacgatgtcc tcttctggg cactgggtgac ggccggctcc acaaggcagt gagcgtgggc 1440
 ccccggtgac acatcattga ggagctgcag atcttctcat cgggacagcc cgtgcagaat 1500
 ctgctcctgg acaccacag ggggctgctg tatgcggcct cacactcggg cgtagtccag 1560
 gtgcccattg ccaactgcag cctgtaccgg agcgtgggg actgccctcct cggccgggac 1620
 ccctactgtg ctgggagcg ctccagctgc aagcacgta gccctiacca gcctcagctg 1680
 gccaccaggc cgtggatcca ggacatcgag ggagccagcg ccaaggacct ttgcagcgcg 1740
 tcttcggttg tgtcccgctc tttgtacca acaggggaga agccatgtga gcaagtccag 1800
 tccagccca acacagtga cactttggcc tggccgctcc tctccaacct ggcgaccga 1860
 ctctggctac gcaacggggc ccccgtaat gccctggcct cctgccacgt gctaccact 1920
 ggggacctgc tgcgtgggg caccacacag ctgggggagt tccagtgtg gtcactagag 1980
 gagggcttcc agcagctggt agccagctac tgccagagg tggtaggagga cgggggtgca 2040
 gaccaaacag atgagggtgg cagtgtacc gtcattatca gcacatcgcg tgtgagtga 2100
 ccagctggtg gcaaggccag ctgggggtgca gacaggtcct actggaagga gtctctggtg 2160
 atgtgcacgc tctttgtgt ggccgtgctg ctccagttt tattcttgct ctaccggcac 2220
 cggaacagca tgaaagtctt cctgaagcag ggggaatgtg ccagcgtgca cccaagacc 2280
 tgccctgtgg tgcgtcccc tgagaccgc cactcaacg gcctagggcc cctagcacc 2340
 ccactcgatc accgagggtg ccagtcctg tcagacagcc cccgggggtc ccgagcttc 2400
 actgagtcag agaagaggcc actcagcatc caagacagct tcgtggaggt atccccagt 2460
 tgccccggc cccgggtccg ccttggctcg gagatccgtg actctgtgtg g 2511

<210> 6

<211> 3766

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

gcctctgcca agccgaggct gcggggccgg cgccggcggg aggactgcgg tgcggcgagg 60
aggggctgag ttigccaggg cccacttgac cctgtttccc acctcccgcc cccaggticc 120
ggaggcgagg gccccgggg cgactcgggg gcggaccgcg gggcgaggct gccgcccgtg 180
agtccggccg agccacctga gcccgagccg cgggacaccg tcgctcctgc tctccgaatg 240
ctgcgcaccg cgatgggcct gaggagctgg ctgcggccc catggggcgc gctgccgcct 300
cggccaccgc tgcctgtgct cctgtacttg ctgctcctgc tgcagccacc gcctccgacc 360
tgggcgctca gccccggat cagcctgcct ctgggctctg aagagcggcc attcctcaga 420
ttcgaagctg aacacatctc caactacaca gcccttctgc tgagcaggga tggcaggacc 480
ctgtacgtgg gtgctcgaga ggccctcttt gcactcagta gcaacctcag ctctctgcca 540
ggcggggagt accaggagct gctttggggt gcagacgcag agaagaaaca gcagtgcagc 600
ttcaaggga aggaccaca gcgcgactgt caaaactaca tcaagatcct cctgccgctc 660
agcggcagtc acctgttcac ctgtggcaca gcagccttca gcccctgtg tacctacatc 720
aacaatggaga acttcacccct ggcaaggagc gagaaggga atgtcctcct ggaagatggc 780
aagggcggt gtcccttcga cccgaatttc aagtcactg ccttggtgtg tgatggcgag 840
ctctacactg gaacagtcct cagcttccaa gggaatgacc cggccatctc gcggagccaa 900
agccttcgcc ccaccaagac cgagagctcc ctcaactggc tgcaagacc accttttgtg 960
gcctcagcct acattcctga gagcctgggc agcttgcaag gcgatgatga caagatctac 1020
ttttcttca gcgagactgg ccaggaattt gattctttg agaacacat tgtgtccgc 1080
attgccgca tctgcaaggc cgatgagggt ggagagcggg tgctacagca gcgttgacc 1140
tccttcctca aggccagct gctgtgctca cggcccgacg atggcttccc cttaacgtg 1200
ctgcaggatg tcttcagct gagccccagc cccaggact ggctgacac cctttctat 1260
gggtcttca ctcccagtg gcacaggga actacagaag gctctgccgt ctgtgtctc 1320
acaatgaagg atgtgcagag agtcttcagc ggcctctaca aggaggtaga ccgtgagaca 1380
cagcagatgg tacaccgta cccaccgtg cccacacccc ggcttgagc gtgcacacc 1440
aacagtccc gggaaggaa gatcaactca tcctgcagc tccagaccg cgtgctgaac 1500
ttctcaagg accattcct gatggacggg caggctccga gccgcatgct gctgctgcag 1560
ccccaggct gctaccagc cgtggctgta caccgcgtc ctggcctgca ccacacctac 1620
gatgtcctct tcctgggcac tggtagggc cggctccaca aggagtagc cgtgggcccc 1680
cgggtgcaca tcattgagga gctgcagatc ttctcatcgg gacagcccg gcagaatctg 1740

ctcctggaca cccacagggg gctgctglat gcggcctcac actcgggcgt agtccaggtg 1800
cccatggcca actgcagcct gtaccggagc tgtggggact gcctcctcgc cggggacccc 1860
tactgtgctt ggagcggctc cagctgcaag cacgtcagcc tctaccagcc tcagctggcc 1920
accaggccgt ggatccagga catcgaggga gccagcgcca aggacctttg cagcgcgtct 1980
tcggttgtgt ccccgctctt tgtaccaaca ggggagaagc catgtagca agtccagttc 2040
cagcccaaca cagtgaacac ttggcctgc ccgctcctct ccaacctggc gacccgactc 2100
tggctacgca acggggcccc cgtaaatgcc tcggcctcct gccacgtgct acccactggg 2160
gacctgctgc tggtagggcac ccaacagctg ggggagttcc agtgcctggc actagaggag 2220
ggcttccagc agctggtagc cagctactgc ccagaggtagg tggaggacgg ggtggcagac 2280
caaacagatg agggtaggcag tgtaccgctc attatcagca catcgctgti gactgcacca 2340
gctggtaggc aggccagctg gggtagcagc aggtcctact ggaaggagtt cctggtagt 2400
tgcacgctct ttgtgctggc cgtgctgctc ccagttttat tcttgctcta ccggcaccgg 2460
aacagcatga aagtcttctt gaagcagggg gaatgtgcca gcgtgcaccc caagacctgc 2520
cctgtggtagc tgcctctga gacccgcca ctcaacggcc tagggcccc tagcacccca 2580
ctcgatcacc gaggttacc gtcctgtca gacagcccc cggggtcccg agtcttact 2640
gagtcagaga agaggccact cagcatccaa gacagcttcg tggaggtatc ccagctgctc 2700
ccccggcccc gggtagcctt tggctcggag atccgtgact ctgtgggtgt agagctgact 2760
tccagaggac gctgccctgg cttcaggggc tgtgaatgti cggagagggt caactggacc 2820
tcccctccgc tctgctcttc gtggaacacg accgtggtagc ccggcccttg ggagccttgg 2880
ggccagctgg cctgctgctc tccagtcaag tagcgaagct cctaccacc agacacccaa 2940
acagccgtag cccagaggt cctggccaaa tatgggggcc tgcctagggt ggtggaacag 3000
tgctccttat gtaactgag ccttttgttt aaaaaacaat tccaatgtg aaactagaat 3060
gagagggaag agatagcatg gcatgcagca cacacggctg ctccagttca tggcctccca 3120
ggggtgctgg ggatgcatcc aaagtgggtg tctgagacag agttggaaac cctcaccac 3180
tggcctcttc acctccaca ttatccgct gccaccggct gccctgtctc actgcagatt 3240
caggaccagc ttgggctgcg tgcgttctgc ctggccagtc agccgaggat gtagttgtt 3300
ctgccgtcgt cccaccacct cagggaccag agggctagggt tggcactgcg gccctacca 3360
ggtcctgggc tggacccaa ctcctggacc ttccagcct gtatcaggct gtggccacac 3420
gagaggacag cgcgagctca ggagagattt cgtgacaatg tacgccttcc cctcagaatt 3480

17/36

cagggaagag actgtgcct gccttcctcc gttgttcgt gagaaccgt gtgccccttc 3540
 ccaccataic caccctcgct ccatacittga actcaaacac gaggaactaa ctgcaccctg 3600
 gtctctctcc cagtcctcag ttaccctcc atccctcacc ttcttccact ctaaggata 3660
 tcaacactgc ccagcacagg ggccctgaat ttatgtggtt ttatacatt ttttaataag 3720
 atgcacttta tgtcattttt taataaagtc tgaagaatta ctgttt 3766

<210> 7

<211> 837

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

Met Leu Arg Thr Ala Met Gly Leu Arg Ser Trp Leu Ala Ala Pro Trp
 5 10 15
 Gly Ala Leu Pro Pro Arg Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 20 25 30
 Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Pro Thr Trp Ala Leu Ser Pro Arg Ile
 35 40 45
 Ser Leu Pro Leu Gly Ser Glu Glu Arg Pro Phe Leu Arg Phe Glu Ala
 50 55 60
 Glu His Ile Ser Asn Tyr Thr Ala Leu Leu Leu Ser Arg Asp Gly Arg
 65 70 75 80
 Thr Leu Tyr Val Gly Ala Arg Glu Ala Leu Phe Ala Leu Ser Ser Asn
 85 90 95
 Leu Ser Phe Leu Pro Gly Gly Glu Tyr Gln Glu Leu Leu Trp Gly Ala
 100 105 110
 Asp Ala Glu Lys Lys Gln Gln Cys Ser Phe Lys Gly Lys Asp Pro Gln
 115 120 125
 Arg Asp Cys Gln Asn Tyr Ile Lys Ile Leu Leu Pro Leu Ser Gly Ser
 130 135 140

18/36

His Leu Phe Thr Cys Gly Thr Ala Ala Phe Ser Pro Met Cys Thr Tyr
 145 150 155 160
 Ile Asn Ile Glu Asn Phe Thr Leu Ala Arg Asp Glu Lys Gly Asn Val
 165 170 175
 Leu Leu Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro Asn Phe Lys
 180 185 190
 Ser Thr Ala Leu Val Val Asp Gly Glu Leu Tyr Thr Gly Thr Val Ser
 195 200 205
 Ser Phe Gln Gly Asn Asp Pro Ala Ile Ser Arg Ser Gln Ser Leu Arg
 210 215 220
 Pro Thr Lys Thr Glu Ser Ser Leu Asn Trp Leu Gln Asp Pro Ala Phe
 225 230 235 240
 Val Ala Ser Ala Tyr Ile Pro Glu Ser Leu Gly Ser Leu Gln Gly Asp
 245 250 255
 Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Phe Phe Ser Glu Thr Gly Gln Glu Phe Glu
 260 265 270
 Phe Phe Glu Asn Thr Ile Val Ser Arg Ile Ala Arg Ile Cys Lys Gly
 275 280 285
 Asp Glu Gly Gly Glu Arg Val Leu Gln Gln Arg Trp Thr Ser Phe Leu
 290 295 300
 Lys Ala Gln Leu Leu Cys Ser Arg Pro Asp Asp Gly Phe Pro Phe Asn
 305 310 315 320
 Val Leu Gln Asp Val Phe Thr Leu Ser Pro Ser Pro Gln Asp Trp Arg
 325 330 335
 Asp Thr Leu Phe Tyr Gly Val Phe Thr Ser Gln Trp His Arg Gly Thr
 340 345 350
 Thr Glu Gly Ser Ala Val Cys Val Phe Thr Met Lys Asp Val Gln Arg
 355 360 365
 Val Phe Ser Gly Leu Tyr Lys Glu Val Asn Arg Glu Thr Gln Gln Met

19/36

370	375	380
Val His Arg Asp Pro Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly Ala Cys Ile		
385	390	395
Thr Asn Ser Ala Arg Glu Arg Lys Ile Asn Ser Ser Leu Gln Leu Pro		400
	405	410
Asp Arg Val Leu Asn Phe Leu Lys Asp His Phe Leu Met Asp Gly Gln		415
	420	425
Val Arg Ser Arg Met Leu Leu Leu Gln Pro Gln Ala Arg Tyr Gln Arg		430
	435	440
Val Ala Val His Arg Val Pro Gly Leu His His Thr Tyr Asp Val Leu		445
	450	455
Phe Leu Gly Thr Gly Asp Gly Arg Leu His Lys Ala Val Ser Val Gly		460
465	470	475
Pro Arg Val His Ile Ile Glu Glu Leu Gln Ile Phe Ser Ser Gly Gln		480
	485	490
Pro Val Gln Asn Leu Leu Leu Asp Thr His Arg Gly Leu Leu Tyr Ala		495
	500	505
Ala Ser His Ser Gly Val Val Gln Val Pro Met Ala Asn Cys Ser Leu		510
	515	520
Tyr Arg Ser Cys Gly Asp Cys Leu Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala		525
	530	535
Trp Ser Gly Ser Ser Cys Lys His Val Ser Leu Tyr Gln Pro Gln Leu		540
545	550	555
Ala Thr Arg Pro Trp Ile Gln Asp Ile Glu Gly Ala Ser Ala Lys Asp		560
	565	570
Leu Cys Ser Ala Ser Ser Val Val Ser Pro Ser Phe Val Pro Thr Gly		575
	580	585
Glu Lys Pro Cys Glu Gln Val Gln Phe Gln Pro Asn Thr Val Asn Thr		590
	595	600
		605

20/36

Leu Ala Cys Pro Leu Leu Ser Asn Leu Ala Thr Arg Leu Trp Leu Arg
 610 615 620
 Asn Gly Ala Pro Val Asn Ala Ser Ala Ser Cys His Val Leu Pro Thr
 625 630 635 640
 Gly Asp Leu Leu Leu Val Gly Thr Gln Gln Leu Gly Glu Phe Gln Cys
 645 650 655
 Trp Ser Leu Glu Glu Gly Phe Gln Gln Leu Val Ala Ser Tyr Cys Pro
 660 665 670
 Glu Val Val Glu Asp Gly Val Ala Asp Gln Thr Asp Glu Gly Gly Ser
 675 680 685
 Val Pro Val Ile Ile Ser Thr Ser Arg Val Ser Ala Pro Ala Gly Gly
 690 695 700
 Lys Ala Ser Trp Gly Ala Asp Arg Ser Tyr Trp Lys Glu Phe Leu Val
 705 710 715 720
 Met Cys Thr Leu Phe Val Leu Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Phe Leu
 725 730 735
 Leu Tyr Arg His Arg Asn Ser Met Lys Val Phe Leu Lys Gln Gly Glu
 740 745 750
 Cys Ala Ser Val His Pro Lys Thr Cys Pro Val Val Leu Pro Pro Glu
 755 760 765
 Thr Arg Pro Leu Asn Gly Leu Gly Pro Pro Ser Thr Pro Leu Asp His
 770 775 780
 Arg Gly Tyr Gln Ser Leu Ser Asp Ser Pro Pro Gly Ser Arg Val Phe
 785 790 795 800
 Thr Glu Ser Glu Lys Arg Pro Leu Ser Ile Gln Asp Ser Phe Val Glu
 805 810 815
 Val Ser Pro Val Cys Pro Arg Pro Arg Val Arg Leu Gly Ser Glu Ile
 820 825 830
 Arg Asp Ser Val Val

835

<210> 8

<211> 2511

<212> DNA

<213> Human

<400> 8

```
atgctgcgca ccgcgatggg cctgaggagc tggctcgccg ccccatgggg cgcgctgccg      60
cctcggccac cgctgctgct gctcctgctg ctgctgctcc tgcctgcagcc gccgcctccg      120
acctggggcg tcagcccccg gatcagccta cctctgggct ctgaagagcg gccattcctc      180
agattcgaag ctgaacacat ctccaactac acagcccttc tgcctgagcag ggatggcagg      240
acctgtacg tgggtgctcg agaggccctc ttgcaactca gtagcaacct cagcttcctg      300
ccaggcgggg agtaccagga gctgctttgg ggtgcagacg cagagaagaa acagcagtcg      360
agcttcaagg gcaaggaccc acagcgcgac tgcataaact acatcaagat cctccigccg      420
ctcagcggca gtcacctgtt cacctgtggc acagcagcct tcagcccat gtgtacctac      480
atcaacatag agaacttcac cctggcaagg gacgagaagg ggaatgttct cctggaagat      540
ggcaagggcc gtgttcctt cgacccgaat ttcaagtcca ctgccctggt ggttgatggc      600
gagctctaca ctggaacagt cagcagcttc caagggaatg acccgccat ctgcggagc      660
caaagccttc gcccaccaa gaccgagagc tccctcaact ggctgcaaga cccagctttt      720
gtggcctcag cctacattcc tgagagcctg ggcagcttgc aaggcgatga tgacaagatc      780
tactttttct tcagcgagac tggccaggaa tttagattct ttgagaacac cattgtgtcc      840
cgcatlgccc gcatctgcaa gggcgatgag ggtggagagc gggctgtaca gcagcgctgg      900
acctccttcc tcaaggccca gctgctgtgc tcacggcccc agcatggctt ccccttcaac      960
gtgctgcagg atgtcttcac gctgagcccc agccccagg actggcgiga cacccttttc     1020
tatggggctt tcacttccca gtggcacagg ggaactacag aaggctctgc cgtctgtgtc     1080
ttcacaatga aggatgigca gagagtcttc agcggcctct acaaggaggt gaaccgtgag     1140
acacagcaga tggtaacacc tgaccacccc gtgcccacac cccggcctgg agcgtgcac      1200
accaacagtg cccgggaag gaagatcaac tcatccctgc agctcccaga ccgcgtgtg      1260
aacttctca aggaccatt cctgatggac gggcaggctc gaagccgcat gctgctgtg      1320
```

cagccccagg ctgctacca gcgcgtggct gtacaccgcg tccctggcct gcaccacacc 1380
 tacgatgtcc tcttccctggg cactgggtgac ggccgggtcc acaaggcagt gagcgtgggc 1440
 ccccggtgac acatcatiga ggagctgcag atcttctcat cgggacagcc cgtgcagaat 1500
 ctgctcctgg acaccacag ggggtgctg tatgcggcct cacactcggg cgtagtccag 1560
 gtgcccattgg ccaactgcag cctgtacagg agctgtgggg actgcctcct cgcccgggac 1620
 ccctactgtg ctggagcgg ctccagctgc aagcacgtca gcctctacca gcctcagctg 1680
 gccaccaggc cgtggatcca ggacatcgag ggagccagcg ccaaggacct ttgcagcgcg 1740
 tcttcggttg tgtcccgctc ttttgtacca acaggggaga agccatgtga gcaagtccag 1800
 ttcagccca acacagtga cactttggcc tgcccgctcc tctccaacct ggcgaccga 1860
 ctctggctac gcaacggggc ccccgtaat gcctcggcct cctgccacgt gctaccact 1920
 ggggacctgc tgcctgggg caccacacag ctgggggagt tccagtgtg gtcactagag 1980
 gagggcttcc agcagctggt agccagctac tgcccagagg tggaggagga cggggtggca 2040
 gaccaaacag atgaggggtg cagtgtaccc gtcattatca gcacatcgcg tgtgagtga 2100
 ccagctggtg gcaaggccag ctgggggtga gacaggctcct aciggaagga gtccctggtg 2160
 atgtgcacgc tctttgtgct ggccgtgctg ctcccagttt tattcttgct ctaccggcac 2220
 cggaacagca tgaagtcct cctgaagcag ggggaatgtg ccagcgtga cccaagacc 2280
 tgccctgtgg tgcgtcccc tgagaccgc cactcaacg gcctagggcc ccctagcacc 2340
 ccgtcgate accgagggtg ccagtcctg tcagacagcc cccgggggtc ccgagcttc 2400
 actgagtcag agaagaggcc actcagcatc caagacagct tcgtggaggt atccccagt 2460
 tgccccggc cccgggtccg ccttggctcg gagatccgtg actctgtgtg g 2511

<210> 9

<211> 3766

<212> DNA

<213> Human

<400> 9

gctctgccc agccgaggct gcggggccgg cgccggcggg aggactgcgg tgccccgcgg 60
 aggggtgag ttgtccaggg cccacttgac cctgtttccc acctcccgcc cccaggtcc 120
 ggaggcgggg gccccgggg cgactcgggg gcggaccgcg gggcggagct gccgcccgtg 180

agtccggccg agccacctga gcccagagccg cgggacaccg tgcctcctgc tctccgaatg 240
 ctgcgcaccg cgaatgggctt gaggagctgg ctgcgcgccc catggggcgc gctgccgctt 300
 cggccaccgc tgcctgctgt cctgctgctg ctgctcctgc tgcagccgcc gccctccgacc 360
 tgggcgctca gccccggat cagcctacct ctgggctctg aagagcggcc attcctcaga 420
 ttcgaagctg aacacatctc caactacaca gcccttctgc tgagcaggga tggcaggacc 480
 ctgtacgtgg gtgctcgaga ggccctcttt gcactcagta gcaacctcag ctctctgcca 540
 ggccggggagt accaggagct gctttggggt gcagacgcag agaagaaaca gcagtgcagc 600
 ttcaaggga aggaccaca gcgcgactgt caaaactaca tcaagatcct cctgccgctc 660
 agcggcagtc acctgttac ctgtggcaca gcagccttca gcccctgtg tacctacatc 720
 aacatagaga acttcacctt ggcaaggagc gagaaggga atgttctctt ggaagatggc 780
 aagggccgtt gtcccttcga cccgaatttc aagtccactg ccttggtgtt tgatggcgag 840
 ctctacactg gaacagtcag cagcttccaa gggaatgacc cggccatctc gcggagccaa 900
 agccttcgcc ccaccaagac cgagagctcc ctcaactggc tgcaagacc agcttttgtg 960
 gcctcagctt acattcctga gagcctgggc agcttgcaag gcgatgatga caagatctac 1020
 ttttcttca gcgagactgg ccaggaattt gagttctttg agaacacat tgtgtccgc 1080
 attgcccga tctgcaaggc cgaatgaggt ggagagcggg tgctacagca gcgttgacc 1140
 tcttcttca agggccagct gctgtgctca cggcccgacg atggcttccc cttaacgtg 1200
 ctgcaggaig tcttcacgtt gagccccagc cccaggact ggctgacac cctttctat 1260
 ggggtcttca ctcccagtg gcacaggga actacagaag gctctgccgt ctgtgtctc 1320
 acaatgaagg atgtgcagag agtcttcagc ggcctctaca aggaggtgaa ccgtgagaca 1380
 cagcagatgg tacaccgtga cccaccgtg cccacacccc ggcttgagc gtgcattacc 1440
 aacagtccc gggaaaggaa gatcaactca tccctgcagc tccagaccg cgtgtgaac 1500
 ttcctcaagg accatttctt gatggacggg caggctcgaa gccgcatgct gctgtgcag 1560
 cccaggctc gctaccagc cgtggctgta caccgcgtcc ctggcctgca ccacacctac 1620
 gatgtctct tctgggcac tggtagggc cggctccaca aggagtgag cgtgggcccc 1680
 cgggtgcaca tcaatgagga gctgcagatc ttctcatcgg gacagccgtt gcagaatctg 1740
 ctcttgaca cccacagggg gctgctgtat gcggcctcac actcgggctt agtccagggt 1800
 cccatggcca actgcagctt gtacaggagc tgtggggact gccctctcgc ccgggacccc 1860
 tactgtgctt ggagcggctc cagctgcaag cagctcagcc tctaccagcc tcagctggcc 1920

accaggccgt ggatccagga catcgaggga gccagcgcca aggaccitig cagcgcgtct 1980
tcggtttgtt ccccgctttt tgtaccaaca ggggagaagc catgtgagca agtccagtgc 2040
cagcccaaca cagtgaacac ttggccctgc ccgcicctct ccaacctggc gacccgactc 2100
tggctacgca acggggcccc cgtcaatgcc tggccctcct gccacgtgct acccactggg 2160
gacctgctgc tgggtggcac ccaacagctg ggggagttcc agtgctggc actagaggag 2220
ggcttccagc agctggtagc cagctactgc ccagaggtgg tggaggacgg ggtggcagac 2280
caaacagatg aggggtggcag tgtaccgcgc attatcagca catcgcggtg gagtgcacca 2340
gctgggtggca aggccagctg ggggtgcagac aggtcctact ggaaggagtt cctggtgatg 2400
tgcacgctct ttgtgctggc cgtgctgctc ccagttttat tcttgctcta ccggcaccgg 2460
aacagcatga aagtccttct gaagcagggg gaatgtgcca gcgtgcaccc caagacctgc 2520
cctgtgggtg tgccttcctg gacccgcccc ctcaacggcc tagggcccc tagcaccctg 2580
ctcgatcacc gagggatcca gtccctgtca gacagcccc cggggctccg agtcttact 2640
gagtcagaga agaggccact cagcatccaa gacagcttcg tggaggtatc cccagtgtgc 2700
ccccggcccc gggctcgcct tggctcggag atccgtgact ctgtgggtgtg agagctgact 2760
tccagaggac gctgccctgg ctccaggggc tgtgaatgct cggagagggt caactggacc 2820
tccccctcgc tctgtctctc gtggaacacg accgtgggtg ccggcccttg ggagccttgg 2880
ggccagctgg cctgctgctc tccagtcaag tagcgaagct cctaccaccc agacacccaa 2940
acagccgtgg cccagagggt cctggccaaa tatgggggcc tgcctagggt ggtggaacag 3000
tgctccttat gtaactgag ccctttgttt aaaaaacaat tccaaatgtg aaactagaat 3060
gagagggaag agatagcatg gcatgcagca cacacggctg ctccagttca tggcctccca 3120
gggtgctgg ggatgcatcc aaagtgggtg tctgagacag agttggaaac cctcaccaac 3180
tggcctcttc acctccaca ttatcccgct gccaccggct gccctgtctc actgcagatt 3240
caggaccagc ttgggtgctg tgcgttctgc cttgccagtc agccgaggat gtagttgttg 3300
ctgccgtcgt cccaccacct cagggaccag agggctaggt tggcactgcg gccctacca 3360
ggctctgggc tggacccaa ctctggacc ttccagcct giatcaggct gtggccacac 3420
gagaggacag cgcgagctca ggagagattt cgtgacaatg tacgccttc cctcagaatt 3480
cagggaagag actgtgcct gccttcctcc gttgttgcgt gagaaccctg gtgccccctc 3540
ccaccatac caccctgct ccatcttga actcaaacac gaggaactaa ctgcaccctg 3600
gtcctctccc cagtcctccag ttaccctcc atccctcacc ttcttccact ctaagggaia 3660

25/36

tcaacactgc ccagcacagg ggccctgaat ttaatgtgggt ttatacatt ttttaataag 3720
 atgcacttta tgcattttt taataaagtc tgaagaatta ctgttt 3766

<210> 10

<211> 837

<212> PRT

<213> Human

<400> 10

Met Leu Arg Thr Ala Met Gly Leu Arg Ser Trp Leu Ala Ala Pro Trp

5

10

15

Gly Ala Leu Pro Pro Arg Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu

20

25

30

Leu Leu Leu Gln Pro Pro Pro Pro Thr Trp Ala Leu Ser Pro Arg Ile

35

40

45

Ser Leu Pro Leu Gly Ser Glu Glu Arg Pro Phe Leu Arg Phe Glu Ala

50

55

60

Glu His Ile Ser Asn Tyr Thr Ala Leu Leu Leu Ser Arg Asp Gly Arg

65

70

75

80

Thr Leu Tyr Val Gly Ala Arg Glu Ala Leu Phe Ala Leu Ser Ser Asn

85

90

95

Leu Ser Phe Leu Pro Gly Gly Glu Tyr Gln Glu Leu Leu Trp Gly Ala

100

105

110

Asp Ala Glu Lys Lys Gln Gln Cys Ser Phe Lys Gly Lys Asp Pro Gln

115

120

125

Arg Asp Cys Gln Asn Tyr Ile Lys Ile Leu Leu Pro Leu Ser Gly Ser

130

135

140

His Leu Phe Thr Cys Gly Thr Ala Ala Phe Ser Pro Met Cys Thr Tyr

145

150

155

160

Ile Asn Met Glu Asn Phe Thr Leu Ala Arg Asp Glu Lys Gly Asn Val

26/36

165	170	175
Leu Leu Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro Asn Phe Lys		
180	185	190
Ser Thr Ala Leu Val Val Asp Gly Glu Leu Tyr Thr Gly Thr Val Ser		
195	200	205
Ser Phe Gln Gly Asn Asp Pro Ala Ile Ser Arg Ser Gln Ser Leu Arg		
210	215	220
Pro Thr Lys Thr Glu Ser Ser Leu Asn Trp Leu Gln Asp Pro Ala Phe		
225	230	235
Val Ala Ser Ala Tyr Ile Pro Glu Ser Leu Gly Ser Leu Gln Gly Asp		
245	250	255
Asp Asp Lys Ile Tyr Phe Phe Phe Ser Glu Thr Gly Gln Glu Phe Glu		
260	265	270
Phe Phe Glu Asn Thr Ile Val Ser Arg Ile Ala Arg Ile Cys Lys Gly		
275	280	285
Asp Glu Gly Gly Glu Arg Val Leu Gln Gln Arg Trp Thr Ser Phe Leu		
290	295	300
Lys Ala Gln Leu Leu Cys Ser Arg Pro Asp Asp Gly Phe Pro Phe Asn		
305	310	315
Val Leu Gln Asp Val Phe Thr Leu Ser Pro Ser Pro Gln Asp Trp Arg		
325	330	335
Asp Thr Leu Phe Tyr Gly Val Phe Thr Ser Gln Trp His Arg Gly Thr		
340	345	350
Thr Glu Gly Ser Ala Val Cys Val Phe Thr Met Asn Asp Val Gln Arg		
355	360	365
Val Phe Ser Gly Leu Tyr Lys Glu Val Asn Arg Glu Thr Gln Gln Met		
370	375	380
Val His Arg Asp Pro Pro Val Pro Thr Pro Arg Pro Gly Ala Cys Ile		
385	390	395
		400

27/36

Thr Asn Ser Ala Arg Glu Arg Lys Ile Asn Ser Ser Leu Gln Leu Pro
 405 410 415
 Asp Arg Val Leu Asn Phe Leu Lys Asp His Phe Leu Met Asp Gly Gln
 420 425 430
 Val Arg Ser Arg Met Leu Leu Leu Gln Pro Gln Ala Arg Tyr Gln Arg
 435 440 445
 Val Ala Val His Arg Val Pro Gly Leu His His Thr Tyr Asp Val Leu
 450 455 460
 Phe Leu Gly Thr Gly Asp Gly Arg Leu His Lys Ala Val Ser Val Gly
 465 470 475 480
 Pro Arg Val His Ile Ile Glu Glu Leu Gln Ile Phe Ser Ser Gly Gln
 485 490 495
 Pro Val Gln Asn Leu Leu Leu Asp Thr His Arg Gly Leu Leu Tyr Ala
 500 505 510
 Ala Ser His Ser Gly Val Val Gln Val Pro Met Ala Asn Cys Ser Leu
 515 520 525
 Tyr Arg Ser Cys Gly Asp Cys Leu Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala
 530 535 540
 Trp Ser Gly Ser Ser Cys Lys His Val Ser Leu Tyr Gln Pro Gln Leu
 545 550 555 560
 Ala Thr Arg Pro Trp Ile Gln Asp Ile Glu Gly Ala Ser Ala Lys Asp
 565 570 575
 Leu Cys Ser Ala Ser Ser Val Val Ser Pro Ser Phe Val Pro Thr Gly
 580 585 590
 Glu Lys Pro Cys Glu Gln Val Gln Phe Gln Pro Asn Thr Val Asn Thr
 595 600 605
 Leu Ala Cys Pro Leu Leu Ser Asn Leu Ala Thr Arg Leu Trp Leu Arg
 610 615 620
 Asn Gly Ala Pro Val Asn Ala Ser Ala Ser Cys His Val Leu Pro Thr

28/36

625 630 635 640
 Gly Asp Leu Leu Leu Val Gly Thr Gln Gln Leu Gly Glu Phe Gln Cys
 645 650 655
 Trp Ser Leu Glu Glu Gly Phe Gln Gln Leu Val Ala Ser Tyr Cys Pro
 660 665 670
 Glu Val Val Glu Asp Gly Val Ala Asp Gln Thr Asp Glu Gly Gly Ser
 675 680 685
 Val Pro Val Ile Ile Ser Thr Ser Arg Val Ser Ala Pro Ala Gly Gly
 690 695 700
 Lys Ala Ser Trp Gly Ala Asp Arg Ser Tyr Trp Lys Glu Phe Leu Val
 705 710 715 720
 Met Cys Thr Leu Phe Val Leu Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Phe Leu
 725 730 735
 Leu Tyr Arg His Arg Asn Ser Met Lys Val Phe Leu Lys Gln Gly Glu
 740 745 750
 Cys Ala Ser Val His Pro Lys Thr Cys Pro Val Val Leu Pro Pro Glu
 755 760 765
 Thr Arg Pro Leu Asn Gly Leu Gly Pro Pro Ser Thr Pro Leu Asp His
 770 775 780
 Arg Gly Tyr Gln Ser Leu Ser Asp Ser Pro Pro Gly Ser Arg Val Phe
 785 790 795 800
 Thr Glu Ser Glu Lys Arg Pro Leu Ser Ile Gln Asp Ser Phe Val Glu
 805 810 815
 Val Ser Pro Val Cys Pro Arg Pro Arg Val Arg Leu Gly Ser Glu Ile
 820 825 830
 Arg Asp Ser Val Val
 835

<211> 2511

<212> DNA

<213> Human

<400> 11

atgctgcgca ccgcatggg cctgaggagc tggctcgccg ccccatgggg cgcgctgccg 60
cctcggccac cgtctgtgt gtcctgtgt ctgtgtctcc tgcctcagcc gccgcctccg 120
acctggggcg tcagccccg gatcagcctg cctctgggct ctgaagagcg gccattcctc 180
agattcgaag ctgaacacat ctccaactac acagcccttc tgcctgagcag ggatggcagg 240
acctgttacg tgggtgtctg agaggccctc ttgtcactca gttagcaacct cagcttcctg 300
ccaggcgggg agtaccagga gctgctttgg ggtgcagacg cagagaagaa acagcagtgc 360
agcttcaagg gcaaggacc acagcgcgac tgtcaaaact acatcaagat cctcctgccg 420
ctcagcggca gtcacctgtt cacctgtggc acagcagcct tcagccccat gtgtacctac 480
atcaacatgg agaacttcac cctggcaagg gacgagaagg ggaatgtcct cctggaagat 540
ggcaagggcc gtgttcctt cgacccgaat ttcaagtcca ctgccctggt gggtgatggc 600
gagctctaca ctggaacagt cagcagcttc caagggaatg acccgccat ctgcggagc 660
caaagccttc gcccaccaa gaccgagagc tccctcaact ggctgcaaga ccagctttt 720
gtggcctcag cctacattcc tgagagcctg ggcagcttc aaggcgatga tgacaagatc 780
tactttttct tcagcgagac tggccaggaa tttagattct ttgagaacac cattgtgtcc 840
cgcatlgccc gcatctgcaa gggcgatgag ggtggagagc gggctgtaca gcagcgtgg 900
acctccttc tcaaggccca gctgtgtgtc tcacggcccg acgatggctt ccccttcaac 960
gtgtctcagg atgtcttcac gctgagcccc agccccagg actggcgtga caccctttc 1020
tatggggtct tcacttcca gtggcacagg ggaactacag aaggctctgc cgtctgtgtc 1080
ttcacaatga atgatgtgca gagagtcttc agcggcctct acaaggaggt gaaccgtgag 1140
acacagcaga tggtaaccg tgaccacccc gtgcccacac cccggcctgg agcgtgcatc 1200
accaacagt cccgggaaag gaagatcaac tcattcctgc agctcccaga ccgctgtctg 1260
aactttctca aggaccatt cctgatggac gggcaggtcc gaagccgat gctgtgtgtg 1320
cagccccagg ctgctacca gcgctgggt gtacaccgct tccctggcct gcaccacacc 1380
tacgatgtcc tcttctggg cactgggtgac ggccggctcc acaaggcagt gagcgtgggc 1440
ccccgggtgc acatcatga ggagctgcag atcttctcat cgggacagcc cgtgcagaat 1500

30/36

ctgctcctgg acaccacag ggggctgctg tatgcggcct cacactcggg cgtagtccag 1560
 gtgccaatgg ccaactgcag cctgiaccgg agctgtgggg actgcctcct cgcccgggac 1620
 ccctactgtg ctgggagcgg ciccagctgc aagcacgtca gcctctacca gcctcagctg 1680
 gccaccaggc cgtggatcca ggacatcgag ggagccagcg ccaaggacct ttgcagcgcg 1740
 tcttcggttg tgtcccgctc ttttgtacca acaggggaga agccatgiga gcaagtccag 1800
 ttccagccca acacagtga cactttggcc tgcggctcc tctccaacct ggcgaccga 1860
 ctctggctac gcaacggggc ccccgtaat gcctcggcct cctgccacgt gctaccact 1920
 ggggacctgc tgctggtggg caccacacag ctgggggagt tccagtgtg gtcactagag 1980
 gagggcttcc agcagctggt agccagctac tgcccagagg tggaggagga cggggtggca 2040
 gaccaaacag atgagggtgg cagtgtaccc gtcattatca gcacatcgcg tgtagtgca 2100
 ccagctgggtg gcaaggccag ctgggggtgca gacaggctct actggaagga gticctgggtg 2160
 atgtgcacgc tctttgtgct ggccgtgctg ctcccagitt tattcttgct ctaccggcac 2220
 cggaacagca tgaaagtctt cctgaagcag ggggaatgtg ccagcgtgca ccccaagacc 2280
 tgccctgtgg tgctgcccc tgagaccgc ccactcaacg gcctagggcc ccctagcacc 2340
 ccactcgatc accgagggtt ccagtccttg tcagacagcc ccccggggtc ccgagtcttc 2400
 actgagtcag agaagaggcc actcagcctc caagacagct tcgtggaggt atccccagtg 2460
 tgcccccggc cccgggtccg ccttggctcg gagatccgtg actctgtgtg g 2511

<210> 12

<211> 3766

<212> DNA

<213> Human

<400> 12

gctctgcca agccgaggct gcggggccgg cgccggcggg aggactgcgg tgccccgcgg 60
 aggggctgag ttgtccaggg ccacttgac cctgtttccc acccccccc cccaggtcc 120
 ggaggcgggg gccccgggg cgactcgggg gcggaccgcg gggcggagct gccgcccgtg 180
 agtccggccg agccacctga gcccagccg cgggacaccg tcgtcctgc tctccgaatg 240
 ctgcgcaccg cgatgggctt gaggagctgg ctgcggccc catggggcgc gctgccgcct 300
 cggccaccgc tgctgtgct cctgtgtgtg ctgctcctgc tgcagccgcc gcctccgacc 360

tgggcgctca gccccggat cagcctgcct ctgggctctg aagagcggcc attcctcaga 420
 ttcaagctg aacacatctc caactacaca gcccttcigc tgagcaggga tggcaggacc 480
 ctgtacgtgg gtgctcgaga ggccctcttt gcactcagta gcaacctcag cticctgcc 540
 ggcggggagt accaggagct gctttggggt gcagacgcag agaagaaaca gcagtgcagc 600
 ttcaaggga aggaccaca gcgcgactgt caaaactaca tcaagatcct cctgccgctc 660
 agcggcagtc acctgttcac ctgtggcaca gcagccttca gcccctatgt tacctacatc 720
 aacatggaga acttcacct ggcaaggac gagaaggga atgtcctcct ggaagatggc 780
 aagggccgtt gtcccttcga cccgaatttc aagtccactg ccttggtggt tgatggcgag 840
 ctctacacig gaacagtcag cagcttccaa gggaatgacc cggccatctc gcggagccaa 900
 agccttcgcc ccaccaagac cgagagctcc ctcaactggc tgcaagacc agcttttgtg 960
 gcctcagcct acattcctga gagcctgggc agcttgcaag gcgatgatga caagatctac 1020
 tttttcttca gcgagactgg ccaggaattt gagttctttg agaacacat tggtgccgc 1080
 attgcccga tctgcaagg cgatgagggt ggagagcggg tgctacagca gcgctggacc 1140
 tccttctca agggccagct gctgtgctca cggcccgacg atggcttccc ctcaacgtg 1200
 ctgcaggatg tcttcacgt gagccccagc cccaggact ggcgtgacac cctttctat 1260
 ggggtcttca ctcccagtg gcacaggga actacagaag gctctgccgt ctgtgtctc 1320
 acaatgaatg atgtgcagag agtcttcagc ggctctaca aggaggtgaa ccgtgagaca 1380
 cagcagatgg tacaccgtga cccaccgtg cccacacccc ggcttgagc gtgcacacc 1440
 aacagtccc gggaaaggaa gatcaactca tccctgcagc tccagaccg cgtgctgaac 1500
 ttttcaagg accattcct gatggacggg caggctcgaa gccgcatgt gctgctgcag 1560
 cccaggctc gctaccagcg cgtggctgta cccgcgtcc ctggcctgca ccacacctac 1620
 gatgtcctt tcttgggcac tggtagcggc cggctccaca aggagtgag cgtgggcccc 1680
 cgggtgcaca tcattgagga gctgcagatc ttctcatcgg gacagccgt gcagaatctg 1740
 ctcttgaca cccacagggg gctgtgtat gcggcctcac actcggcgt agtcagggtg 1800
 cccatggcca actgcagcct gtaccggagc tgiggggact gcctcctgc cgggacccc 1860
 tactgtgctt ggagcggctc cagctgcaag cagtcagcc tctaccagc tcagctggcc 1920
 accaggccgt ggatccagga catcgaggga gccagcgcca aggaccttg cagcgcgtct 1980
 tcggttgtgt cccgctcttt tgtaccaaca ggggagaagc catgtgagca agtcagttc 2040
 cagcccaaca cagtgaacac ttggcctgc ccgtcctct ccaacctggc gaccgactc 2100

tggctacgca acggggcccc cgtcaatgcc tggcctcct gccacgtgct acccactggg 2160
 gacctgtgc tggtagggcac ccaacagctg ggggagttcc agtgcctggc actagaggag 2220
 ggcttccagc agctggttagc cagctactgc ccagaggtagg tggaggacgg ggtggcagac 2280
 caaacagatg agggtaggcag tgtaccgcgc attatcagca catcgctgtg gactgcacca 2340
 gctggtggca aggccagctg gggtagcagac aggtcctact ggaaggagtt cctggtgatg 2400
 tgcacgctct ttgtgctggc cgtgctgctc ccagttttat tcttgctcta ccggcaccgg 2460
 aacagcatga aagtcttctt gaagcagggg gaatgtgcca gcgtgcaccc caagacctgc 2520
 cctgtgggtgc tgcctctga gaccgcccc ctcaacggcc tagggcccc tagcaccaca 2580
 ctgatcacc gaggttacc gtccctgtca gacagcccc cggggcccc agtcttact 2640
 gactcagaga agaggccact cagcatcaa gacagcttcg tggaggtatc cccagtgtgc 2700
 ccccgcccc gggtagcct tggctcggag atccgtgact ctgtggtgtg agagctgact 2760
 tccagaggac gctgccctgg cttaggggc tgtgaatgct cggagagggt caactggacc 2820
 tccctccgc tctgctcttc gtggaacac accgtggtgc ccggcccttg ggagcccttg 2880
 ggccagctgg cctgtgctc tccagicaag tagcgaagct cctaccaccc agacacccaa 2940
 acagccgtgg cccagaggi cctggccaaa tatgggggcc tgcctaggtt ggtggaacag 3000
 tgctcttat gtaactgag cctttgttt aaaaaacaat tccaatgtg aaactagaat 3060
 gagagggaag agatagcatg gcatgcagca cacacggctg ctccagtcca tggcctccca 3120
 ggggtgctgg ggatgcatcc aaagtgggtg tctgagacag agttggaaac cctcaccac 3180
 tggcctcttc acctccaca ttaaccgct gccaccggct gccctgtctc actgcagatt 3240
 caggaccagc ttgggtgctg tgcgttctgc ctggccagtc agccgaggat gtagttgttg 3300
 ctgccgtcgt cccaccact cagggaccag agggctaggt tggcactgct gccctacca 3360
 ggtcctgggc tggaccaca ctctggacc ttccagcct gtagcaggct gtggccacac 3420
 gagaggacag cgcgagctca ggagagattt cgtgacaatg tacgccttc cctcagaatt 3480
 cagggaagag actgctgctt gccttctcc gttgttgcgt gagaacccgt gtgccccctc 3540
 ccaccatac caccctgct ccatcttga actcaaacac gaggaactaa ctgcaccctg 3600
 gtctctccc cagtcctcag ttaccctcc atccctcacc ttctccact ctaaggata 3660
 tcaacactgc ccagcacagg ggccctgaat ttatgtggtt ttatacatt ttttaataag 3720
 atgcacttta tgtcatTTTT taataaagtc tgaagaatta ctgitt 3766

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 13

cagtgccaac ctagccctct

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 14

tctcccgatc caaccgtgac

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 15

caacaactac atcctcggct

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide

<400> 16

tcggctccta catcaacaac

20

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 17

cctcgcccg gaccctact gtgc

24

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 18

cttggcgctg gctccctcga tgtcctg

27

<210> 19

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 19

aattgaattc atgctgcgca ccgcgatg

28

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 20

aagctctaga caccacagag tcacgatct

30

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 21

aagctctaga tcacaccaca gagtcacgga

30

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Human

<400> 22

Asn Ser Ala Arg Glu Arg Lys Ile Asn Ser Ser Cys

36/36

5

10

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 23

Ser Val Val Ser Pro Ser Phe Val Pro Thr Gly Glu Lys Pro Cys

5

10

15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 24

Pro Leu Asp His Arg Gly Tyr Gln Ser Leu Ser Asp Ser Pro Cys

5

10

15

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Human

<400> 25

Ser Arg Val Phe Thr Glu Ser Glu Lys Arg Pro Leu Ser Cys

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68, C07K16/18,
A01K67/027, C12N5/10, G01N33/15, G01N33/50, A61K31/711,
A61K38/17, A61K39/395, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/47, C07K14/705, C12N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICSTPLUS, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED,
EMBL/DBBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	WO 02/52005 A1 (Kazusa DNA Research Institute Foundation), 04 July, 2002 (04.07.02), & US 2002/0192748 A1 & AU 200280608 A (Claims; pages 12 to 18; sequence listing, sequence No. 31)	1, 3-5, 8-19, 21-24, 31-32 2, 6-7, 25-27, 29-30, 33-35
<u>X</u> A	WO 00/78961 A1 (GENENTECH, INC.), 28 December, 2000 (28.12.00), & AU 200028837 A (Claims; pages 180 to 182, 355; Figs. 141, 142; sequence listing, sequence Nos. 252, 253)	1, 3-5, 8-19, 21-24, 31-32 2, 6-7, 25-27, 29-30, 33-35

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
28 January, 2004 (28.01.04)

Date of mailing of the international search report
10 February, 2004 (10.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16655

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/12708 A2 (GENENTECH, INC.), 09 March, 2000 (09.03.00), & AU 9955908 A & ZA 200101180 A & EP 1144629 A2 & US 6144037 A & JP 2002-526075 A & JP 2003-518361 A & KR 2003000010 A & MX 2001002238 A1 (Claims; pages 22, 183 to 185; Figs. 141, 142; sequence listing, sequence Nos. 252, 253)	1-19, 21-27, 29-35
X A	WO 02/46465 A2 (OXFORD BIOMEDICA LTD.), 13 June, 2002 (13.06.02), & US 2003/0203372 A1 & AU 200220920 A (Claims; page 256; sequence listing, sequence Nos. 91, 92)	1, 3-5, 8-19, 21-24, 31-32 2, 6-7, 25-27, 29-30, 33-35
X	WO 01/68848 A2 (GENENTECH, INC.), 20 September, 2001 (20.09.01), & AU 200168028 A & US 2002/0090681 A1 & EP 1259614 A2 (Claims 22 to 23; pages 32, 132; Figs. 453, 454; sequence listing, sequence Nos. 453, 454)	1-19, 21-27, 29-35
X	WO 01/77137 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 18 October, 2001 (18.10.01), & AU 200033868 A & EP 1173456 A1 (Claims; page 150; sequence listing, sequence No. 1271)	1-19, 21-27, 29-35
X	WO 01/36440 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 25 May, 2001 (25.05.01), & AU 200119186 A & EP 1235838 A1 & JP 2003-514543 A (Claims; pages 9 to 13, 94 to 102; sequence listing, sequence Nos. 11, 64)	1-19, 21-27, 29-35
X A	WO 02/06329 A2 (CURAGEN CO.), 24 January, 2002 (24.01.02), & AU 200180608 A & US 2002/0192748 A1 (Claims; pages 51 to 58; sequence listing, sequence Nos. 17, 18)	1, 3-5, 8-19, 21-24, 31-32 2, 6-7, 25-27, 29-30, 33-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16655

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20, 37-40

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions according to claims 20 and 37 to 40 pertain to diagnostic methods or therapeutic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) (continued to extra sheet)

2. ☒ Claims Nos.: 28, 36, 41, 42

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

It is completely unknown what specific compounds are involved in the scope of the substances inhibiting the expression of a peptide, a gene, etc. as set forth in claims 28, 36, 41 and 42 and what are not. Thus, the above claims are described in an extremely unclear manner. (Continued to extra sheet.)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16655

Continuation of Box No. I-1 of continuation of first sheet(1)

of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet(1)

Such being the case, no meaningful opinion can be presented concerning the novelty, inventive step and industrial applicability of the inventions according to the above claims and claims depending thereon.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12N15/12, C12P21/02, C12Q1/68,
C07K16/18, A01K67/027, C12N5/10, G01N33/15, G01N33/50,
A61K31/711, A61K38/17, A61K39/395, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C07K14/47, C07K14/705, C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTPLUS, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED,
EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 02/52005 A1 (財団法人かずさディー・エヌ・ エー研究所) 2002.07.04 &US 2002/0192748 A1 &AU 200280608 A (請求の範囲, 第12-18頁, 配列表配列番号31参照)	1,3-5,8-19, 21-24,31-32 2,6-7,25-27, 29-30,33-35
X A	WO 00/78961 A1 (GENENTECH, INC.) 2000.12.28 &AU 200028837 A (請求の範囲, 第180-182, 355頁, 図141, 14 2, 配列表配列番号252, 253参照)	1,3-5,8-19, 21-24,31-32 2,6-7,25-27, 29-30,33-35

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.01.2004

国際調査報告の発送日

10.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/12708 A2 (GENENTECH, INC.) 2000.03.09 &AU 9955908 A &ZA 200101180 A &EP 1144629 A2 &US 6144037 A &JP 2002-526075 A &JP 2003-518361 A &KR 2003000010 A &MX 2001002238 A1 (請求の範囲, 第22, 183-185頁, 図141, 142, 配列表配列番号252, 253参照)	1-19, 21-27, 29-35
X A	WO 02/46465 A2 (OXFORD BIOMEDICA LIMITED) 2002.06.13 &US 2003/0203372 A1 &AU 200220920 A (請求の範囲, 第256頁, 配列表配列番号91, 92参照)	1, 3-5, 8-19, 21-24, 31-32 2, 6-7, 25-27, 29-30, 33-35
X	WO 01/68848 A2 (GENENTECH, INC.) 2001.09.20 &AU 200168028 A &US 2002/0090681 A1 &EP 1259614 A2 (請求の範囲22-23, 第32, 132頁, 図453, 454 配列表配列番号453, 454参照)	1-19, 21-27, 29-35
X	WO 01/77137 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2001.10.18 &AU 200033868 A &EP 1173456 A1 (請求の範囲, 第150頁, 配列表配列番号1271参照)	1-19, 21-27, 29-35
X	WO 01/36440 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2001.05.25 &AU 200119186 A &EP 1235838 A1 &JP 2003-514543 A (請求の範囲, 第9-13, 94-102頁, 配列表配列番号11, 64参照)	1-19, 21-27, 29-35
X A	WO 02/06329 A2 (CURAGEN CO.) 2002.01.24 &AU 200180608 A &US 2002/0192748 A1 (請求の範囲, 第51-58頁, 配列表配列番号17, 18参照)	1, 3-5, 8-19, 21-24, 31-32 2, 6-7, 25-27, 29-30, 33-35

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20, 37-40 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲20, 37-40に係る発明は診断方法または治療方法に該当するから、特許協力条約第17条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 28, 36, 41, 42 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲28, 36, 41, 42に記載のペプチドまたは遺伝子等の発現を阻害する物質については、化合物として具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲及びそれを引用する各請求の範囲に記載された発明に係る新規性、進歩性、産業上の利用可能性についての有意義な見解を示すことができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6:4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。